

**Axoneogenese retinaler Ganglienzellen in Bcl-X<sub>L</sub> transgenen Mäusen  
- Bedeutung von Bcl-X<sub>L</sub> für die Neuroprotektion und Neuroregeneration in  
läsionierten adulten Neuronen des zentralen Nervensystems**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Julia Karin Pester  
geboren am 08.01.1981 in Jena**

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Otto W. Witte, Jena
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Christoph Redies, Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Hans Werner Müller, Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.09.2012

### **Publizierte Originalarbeiten:**

Kretz A, **Marticke JK**, Happold CJ, Schmeer C, Isenmann S.

A primary culture technique of adult retina for regeneration studies on adult CNS neurons. Nature Protocols 2007; 2(1):131-40.

Kretz A, Happold CJ, **Marticke JK**, Isenmann S.

Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. Molecular and Cellular Neuroscience 2005; 29(4):569-79.

### **Abstracts und Poster:**

Kretz A, Happold CJ, **Marticke JK**, Isenmann S.

Effects of Erythropoietin on RGC regeneration and signal transduction mechanism *in vivo* and *in vitro*. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und funktionelle Bildgebung (DGKN), Düsseldorf, 2004.

**Marticke JK**, Kretz A, Parsadanian A, Tausch S, Isenmann S.

Constitutive overexpression of Bcl-X<sub>L</sub> promotes axon regeneration from adult injured retinal ganglion cells in mice. Society of Neuroscience, Washington, USA, 2005. Abstract 436.

### III

Denken ist interessanter als Wissen, aber nicht als Anschauen.

Johann Wolfgang Goethe

**Meinen lieben Eltern**

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	apoptosis inducing factor
AKT	Gene, die für die Proteinkinase B, eine Gruppe von phosphorylierenden Enzymen im Signaltransduktionsweg von Zellen kodieren
Apaf	apoptotic protease activating factor-1
Apo-1/Fas	apoptosis inducing cell surface receptor
ATP	adenosine triphosphate; Adenosintriphosphat
Axo	Axotomie
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated x-protein
Bcl	B-cell lymphoma/leucaemia
Bcl-2	B-cell lymphocytic leucaemia proto-oncogene-2
Bcl-X <sub>L</sub>	“long splicing variant of a Bcl-2 related gene”
Bcl-X <sub>S</sub>	“short splicing variant of a Bcl-2 related gene”
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BH	Bcl-2 homology region
Bid	BH-3 interacting domain death antagonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
bp	Basenpaare
cAMP	cyclic adenosine monophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	cysteine aspartate-specific protease
CD	cluster of differentiation
c-Jun	cellular Jun oncogene, Transkriptionsfaktor
CNTF	ciliary-derived neurotrophic factor
CREB	cyclic AMP response element binding protein
crush	Quetschung des Nervus opticus
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykane
CT-B	Choleratoxin-Untereinheit B
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DISC	death-inducing signalling complex

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
E20	Embryonaltag 20
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas associated death domain
FCS	fetal calf serum
GAP-43	growth associated protein-43
GCL	ganglion cell layer; Ganglienzellschicht
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
HE	Hämatoxylin/Eosin
HRP	horseradish peroxidase
IAP	inhibitors of apoptosis protein
IGF-1	insulin-like growth factor-1; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IN-1	monoclonal antibody raised against neurite growth inhibitors
INL	inner nuclear layer; innere nukleäre Schicht
IPL	inner plexiform layer; innere plexiforme Schicht
Jak-2	Janus-kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LGN	lateral geniculate nucleus; Corpus geniculatum laterale
LINGO1	LRR and Ig domain-containing Nogo-receptor-interacting-protein
MAG	Myelin-assoziierte Glykoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCAO	middle cerebral artery occlusion
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
NF- $\kappa$ B	nuclear factor - $\kappa$ B
NgR1	Nogo-Rezeptor
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophinrezeptor
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
n.s.	nicht signifikant

## VI

OMgp	Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein
ON	optic nerve; Nervus opticus
ONL	outer nuclear layer; äußere nukleäre Schicht
OPL	outer plexiform layer; äußere plexiforme Schicht
p	post
P8	postnatales Entwicklungsstadium; 8 Tage nach der Geburt
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIAS	protein inhibitors of activated STATs
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PTP	permeability transition pore complex
RGZ	retinale Ganglienzelle
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
SC	superior colliculus; Colliculus superior
Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspase / direct IAP binding protein of low pi
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBS	tris buffered saline
TNF	tumor necrosis factor; Tumornekrosefaktor
trk	Tyrosinkinase
trkA	Rezeptor der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie und hochaffiner Bindung von NGF
trkB	Rezeptor der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie und hochaffiner Bindung von BDNF, NT-4 und NT-5
Wt	Wildtyp
wm	whole mount
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Maßeinheiten**

°C	Grad Celsius
g	Gramm
kg	Kilogramm
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
U	Unit



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	VIII
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XII
1. Zusammenfassung .....	XIII
2. Einleitung .....	1
2.1. Das Regenerationsdefizit des zentralen Nervensystems .....	2
2.2. Apoptose .....	10
2.2.1. Caspasen: Exekutoren der Apoptose .....	10
2.2.2. Extrinsischer Signalweg über Todesrezeptoren .....	11
2.2.3. Intrinsischer mitochondrialer Weg .....	11
2.3. Die Bcl-2-Proteinfamilie .....	13
2.3.1. Bcl-X <sub>L</sub> .....	15
2.4. Die Schädigung des Nervus opticus als experimentelles Läsionsmodell .....	16
3. Zielsetzung .....	19
4. Methodik .....	21
4.1. Tiere und Läsionsmodell .....	21
4.2. Phänotypisierung der nativen Retina .....	24
4.3. Axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen <i>in vitro</i> .....	25
4.3.1. Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes .....	25
4.3.2. Immunhistochemie der retinalen Primärkultur .....	27
4.4. Neuroprotektion und axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen <i>in vivo</i> .....	28
4.4.1. <i>In situ</i> -Hybridisierung: Molekularbiologischer Nachweis von Bcl-X <sub>L</sub> Transkripten .....	28
4.4.2. Biochemischer Nachweis .....	34
4.5. Nachweis des Bcl-X <sub>L</sub> Proteins durch Immunoblotverfahren .....	35
4.6. Aufarbeitung und histologische Analyse .....	37
5. Ergebnisse .....	43
5.1. Charakterisierung des transgenen Phänotyps in der nativen Retina .....	43

5.2. Neuroregeneration - Stimulation axonalen Wachstums durch transgene Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression .....	45
5.2.1. Transgene Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression fördert Neuroregeneration <i>in vitro</i> .....	45
5.2.2. Transgene Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression fördert Neuroregeneration <i>in vivo</i> .....	49
5.3. Neuroprotektion - Einfluss transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression auf das Überleben axotomierter retinaler Ganglienzellen .....	56
5.4. Morphologie und Lokalisation neuronaler Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression in der Retina .....	58
5.4.1. Induktion transgener Bcl-X <sub>L</sub> mRNA Transkription in adulten Neuronen der Retina .....	58
5.4.2. Bcl-X <sub>L</sub> Proteinexpression der Retina in der Immunhistochemie .....	60
5.5. Regulation der postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> Expression .....	63
6. Diskussion .....	66
6.1. Einfluss der transgenen Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression in der Retina .....	66
6.2. Regenerationsfördernde Effekte von Bcl-X <sub>L</sub> .....	73
6.2.1. Proregeneratives Potential von Bcl-X <sub>L</sub> <i>in vitro</i> .....	76
6.2.2. Proregeneratives Potential von Bcl-X <sub>L</sub> <i>in vivo</i> .....	78
6.3. Antiapoptotische Effekte von Bcl-X <sub>L</sub> .....	83
6.4. Ausblick .....	85
6.5. Zusammenfassung .....	86
7. Schlussfolgerung .....	88
8. Literaturverzeichnis .....	89
9. Anhang .....	104
Materialien .....	104
Lebenslauf .....	111
Danksagung .....	112
Ehrenwörtliche Erklärung .....	113

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen Myelin-assoziiierter Wachstumsinhibitoren im zentralen Nervensystem (Schwab 2010).....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung intrazellulärer Signalwege und Effekte von Neurotrophinen (NGF) und Nogo-A auf regenerierende Axone des zentralen Nervensystems (Schwab 2010).....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion extrinsisch und intrinsisch vermittelter Apoptose (Budd 2001).....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Läsionsmodells am Nervus opticus und der Struktur der Retina. ....	17
Abbildung 5: Das visuelle System; Überblick. ....	18
Abbildung 6: Retinale Explantatkultur. ....	26
Abbildung 7: Phänotypisierung der nativen Retina der transgenen $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ (A) und $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$ (B) Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (C). ....	44
Abbildung 8: Zytoarchitektur der nativen Retina. ....	45
Abbildung 9: Stimulation der Neuritogenese <i>in vitro</i> unter $Bcl-X_L$ Überexpression. ....	47
Abbildung 10: Quantifizierung der postläsionalen Neuritogenese <i>in vitro</i> unter $Bcl-X_L$ Überexpression.....	48
Abbildung 11: Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus <i>in vivo</i> im $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ und $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$ Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp. Vergleich der transgenen Mauskonstrukte im Longitudinalschnitt. ....	52
Abbildung 12: Quantifizierung axonaler Regeneration anhand des Wachstumsmarkers GAP-43 <i>in vivo</i> .....	53
Abbildung 13: Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus <i>in vivo</i> im $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ transgenen Tier. Transversalschnitt. ....	54
Abbildung 14: Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus <i>in vivo</i> im Wildtyp. Transversalschnitt. ....	55

Abbildung 15: Postläsionales Überleben läsionierter retinaler Ganglienzellen. Quantitative Analyse.....	57
Abbildung 16: <i>In situ</i> -Hybridisierung zur Detektion endogener und transgener Bcl-X <sub>L</sub> mRNA Transkripte mittels <i>antisense</i> hBcl-X <sub>L</sub> -Sonde nativ (A und B) sowie postläsional (C und D).	59
Abbildung 17: <i>In situ</i> -Hybridisierung zur Detektion humaner (transgener) Bcl-X <sub>L</sub> mRNA Transkripte mittels KS/SV 40 p A1 Sonde nativ (A und B) sowie postläsional (C und D). ...	60
Abbildung 18: Prä- und postläsionale Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina. ....	62
Abbildung 19.1: Regulation der Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina von Tα1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> Tieren sowie den Wildtyp-Tieren. Exemplarisch (n = 1 je Mauslinie und Kondition). ....	64
Abbildung 19.2: Statistische Analyse der Quantifizierung der Regulation der Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina von Tα1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> Tieren sowie den Wildtyp-Tieren (n = 3 je Mauslinie und Kondition). ....	65
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Regenerationsmechanismen im zentralen Nervensystem (Schwab 2004).....	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen der verwendeten transgenen Mauslinien. ....	22
Tabelle 2: Methodisch-konzeptionelle Einteilung der Versuchsgruppe der $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ Tiere (2.1), der $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$ Tiere (2.2) und der Wildtyp-Tiere (2.1) mit den jeweiligen Tierzahlen. ....	42
Tabelle 3: Statistische Analyse der Quantifizierung der postläsionalen Neuritogenese <i>in vitro</i> unter $Bcl-X_L$ Überexpression. ....	49

## 1. Zusammenfassung

Ein komplex verschaltetes Netzwerk an verschiedenen Projektions- und Interneuronen sowie deren Fasersystemen stellt die strukturelle und funktionelle Grundlage des zentralen Nervensystems (ZNS) dar und ist gemeinsam mit glialen Populationen für synaptische Transmission, Informationsverarbeitung, Gedächtnisbildung sowie andere sensomotorische und emotionale Funktionen verantwortlich. Eine akute Schädigung zentraler Strukturen führt meist zu einem irreversiblen Verlust von neuronalen Verbindungen und zum neuronalen Zelltod, begleitet von schwerwiegenden funktionellen Defiziten. Postläsional kommt es im zentralen Nervensystem nur zu einer geringfügigen, meist funktionell unbedeutenden Regeneration und damit zur dauerhaften Beeinträchtigung zentralnervöser Leistungen. Daher stellen neuronale Regenerationsprozesse einen wichtigen Bestandteil in der medizinischen Forschung dar, mit dem therapeutischen Ziel, Neurone vor dem Zelltod zu bewahren, die neuronale Regeneration optimalerweise im Sinne einer Restitutio ad integrum zu fördern sowie die Funktionalität der neuronalen Verknüpfungen wiederherzustellen.

Gegenstand dieser Arbeit stellte die Untersuchung des Genproduktes Bcl-X<sub>L</sub> für die Bedeutung als zellintrinsischer Parameter der Neuroprotektion und Neuroregeneration im maturen postläsionalen zentralen Nervensystem dar. Hierzu wurden vergleichend zwei transgene, das Bcl-X<sub>L</sub> Gen unter verschiedenen neuronalen Promotoren überexprimierende Mauslinien untersucht und die axonale Regeneration *in vitro* sowie *in vivo* analysiert. Anhand von retinalen Explantatkulturen sowie an Gewebeschnitten der Retina und des Nervus opticus nach Sehnervenquetschung wurde die Auswirkung von Bcl-X<sub>L</sub> auf das zelluläre Überleben und die axonale Regeneration morphologisch mittels Immunhistochemie, auf Proteinebene mittels Western Blot und auf mRNA Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht.

Anhand der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im zentralen Nervensystem die neuronenspezifische Überexpression des Genproduktes Bcl-X<sub>L</sub> im transgenen Tiermodell regenerative Prozesse stimulieren kann und zeitgleich die Apoptoseresistenz beziehungsweise das Überleben geschädigter Neurone verbessert. Die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in Neuronen wirkte sich proneuritogen *in vitro* und axoneogenetisch *in vivo* aus. Dabei vermittelte das Genprodukt Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo* partiell eine läsionsüberbrückende, axonale Regeneration im Nervus opticus. Die vergleichende Beurteilung der beiden Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien zeigte eine unterschiedliche proregenerative Potenz. Die Überexpression von humanem Bcl-X<sub>L</sub> unter dem

neuronenspezifischen T $\alpha$ 1 $\alpha$ -Tubulinpromotor führte zu einer signifikanten und deutlich stärkeren Stimulation der Regenerationsprozesse *in vitro* und *in vivo* als die Überexpression von murinem Bcl-X<sub>L</sub> unter dem ebenfalls neuronenspezifischen Thy1-Promotor.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Bcl-X<sub>L</sub> ein relevantes Potential zur Stimulation von regenerativen Prozessen in adulten retinalen Ganglienzellen besitzt, die es möglicherweise über eine Inhibition von Läsions-medierter Apoptose, über eine neurotrophe Wirkung mit Erhöhung des Vitalitätsgrades überlebender Neurone und Axone oder über die Neutralisierung wachstumsrestriktiver Faktoren des oligo- und astroglialen Milieus sowie des fibrösen, postläsional gebildeten Narbengewebes vermittelt. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen den limitierten Regenerationsprozess im geschädigten zentralen Nervensystem besser verstehen, und sie sollen dazu beitragen, mögliche Strategien zur zukünftigen therapeutischen Beeinflussbarkeit von Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu entwickeln.

## 2. Einleitung

Die Entwicklung und Reifung des zentralen Nervensystems mit seiner während der Maturation zunehmenden morphologischen und funktionellen Differenzierung erfordert, dass auswachsende Nervenfasern in einer komplexen strukturellen Umgebung und über sehr lange Distanzen ihre Zielzellen in spezifischen Regionen auffinden, um mit ihnen durch synaptische Verknüpfungen funktionelle Schaltkreise auszubilden (Goodman und Shatz 1993, Tessier-Lavigne und Goodman 1996). Diese essentielle Eigenschaft verändert sich irreversibel während und nach der Reifung des zentralen Nervensystems mit der Folge einer starken Limitierung des Wachstumspotentials von Nervenfasern (Axonen) im adulten, postmitotischen Stadium. Auf den ersten Blick imponiert dies als deutlicher Nachteil gegenüber anderen dauerhaft proliferierenden und regenerationsfähigen Organen. Diese Eigenschaft des zentralen Nervensystems ermöglicht andererseits erst die hohe Präzision reiz- und inputabhängiger neuronaler Aktivität, garantiert eine strukturelle Stabilisierung der neuronalen Netzwerke und verhindert die sekundäre Formation unspezifischer, synaptischer Verknüpfungen (Buonomano und Merzenich 1998, Thanos und Mey 1995, Thanos und Mey 2001) sowie konsekutive Fehlfunktionen. Im Gegensatz zu früheren Annahmen resultiert der Reifungs- und Spezifizierungsprozess nicht in vollkommen statischen Bedingungen, sondern behält Möglichkeiten der plastischen Reorganisation dauerhaft bei.

Neurodestruktive Einflüsse wie Trauma, Ischämie, Infektion oder altersabhängige Degeneration führen in hohem Maße zu irreversiblen morphologischen Veränderungen und Funktionsverlusten wie Lähmung, Erblindung, kognitive Störungen oder Demenz, die meist nur geringfügig durch plastische Reorganisation kompensiert werden können. Diese funktionellen Defizite sind neben der Reduktion der Lebensqualität mit erheblichen sozioökonomischen Problemen und Kosten assoziiert. Aktuell existieren lediglich experimentelle Strategien zur neuronalen Reparatur, wie zum Beispiel der Versuch der Neuroprotektion durch Wachstumsfaktoren (Fischer et al. 2001, Fischer et al. 2000, Guo et al. 2003), durch embryonalen Zellersatz (Barinaga 2000) oder der Läsionsüberbrückung durch peripher-nervöse Bypässe (Watanabe et al. 1994, Watanabe et al. 1991). Klinisch anwendbare Strategien zur Neuroprotektion und Stimulation axonaler Regeneration sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht oder nur sehr limitiert im Rahmen weniger Studienkonzepte (Freund et al. 2006, Freund et al. 2007, Xu et al. 2002, Zorner und Schwab 2010) verfügbar. Meist bleiben auch die experimentellen Resultate unzureichend, da die komplexen pathophysiologischen Mechanismen der neuronalen Degeneration und Regeneration noch nicht ausreichend



verstanden sind. Somit besteht die Notwendigkeit neben strukturellen, immunologischen und metabolischen Faktoren auch die molekularen Mechanismen, welche die Regenerationsinsuffizienz des zentralen Nervensystems bedingen, weiter zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit wird die neuroprotektive und neuroregenerative Fähigkeit des Genproduktes Bcl-X<sub>L</sub> als zellintrinsischer regulativer Parameter untersucht.

## 2.1. Das Regenerationsdefizit des zentralen Nervensystems

Anfang des 20. Jahrhunderts formulierte Santiago Ramón y Cajal, einer der führenden Neurowissenschaftler der damaligen Zeit, die These: *„The functional specialization of the brain imposed upon the neurons two great lacunae: proliferative inability and irreversibility of intraprotoplasmatic differentiation. It is for this reason that, once the development has ended the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may regenerate. Pathologists consider it an unimpeachable dogma that there is no regeneration of the central paths, and therefore that there is no restoration of the normal physiology of the interrupted conductors in the spinal cord. A vast series of anatomico-pathological experiments in animals, and an enormous number of clinical cases that have been methodically followed by autopsy, serve as a foundation for this doctrine, which is universally accepted to-day”* (Cajal 1928).

Nach allgemeiner Akzeptanz dieses neuroanatomischen Dogmas dauerte es Jahrzehnte bis die Arbeitsgruppe um Aguayo 1981 erstmals nachwies, dass verletzte Neurone aus dem Rückenmark adulter Ratten grundsätzlich in der Lage sind, zumindest partiell zu regenerieren, und dass durchtrennte Axone das Transplantat eines peripheren Nerven als „Brücke“ für Regenerationsvorgänge nutzen können (David und Aguayo 1981). Weitere Transplantationsexperimente mit Schwann-Zellen bestätigten die Fähigkeit verschiedener Axone des zentralen Nervensystems in Konfrontation mit Gewebe aus dem peripheren Nervensystem nach einer Läsion zu regenerieren (Bunge 1991, Stichel et al. 1996).

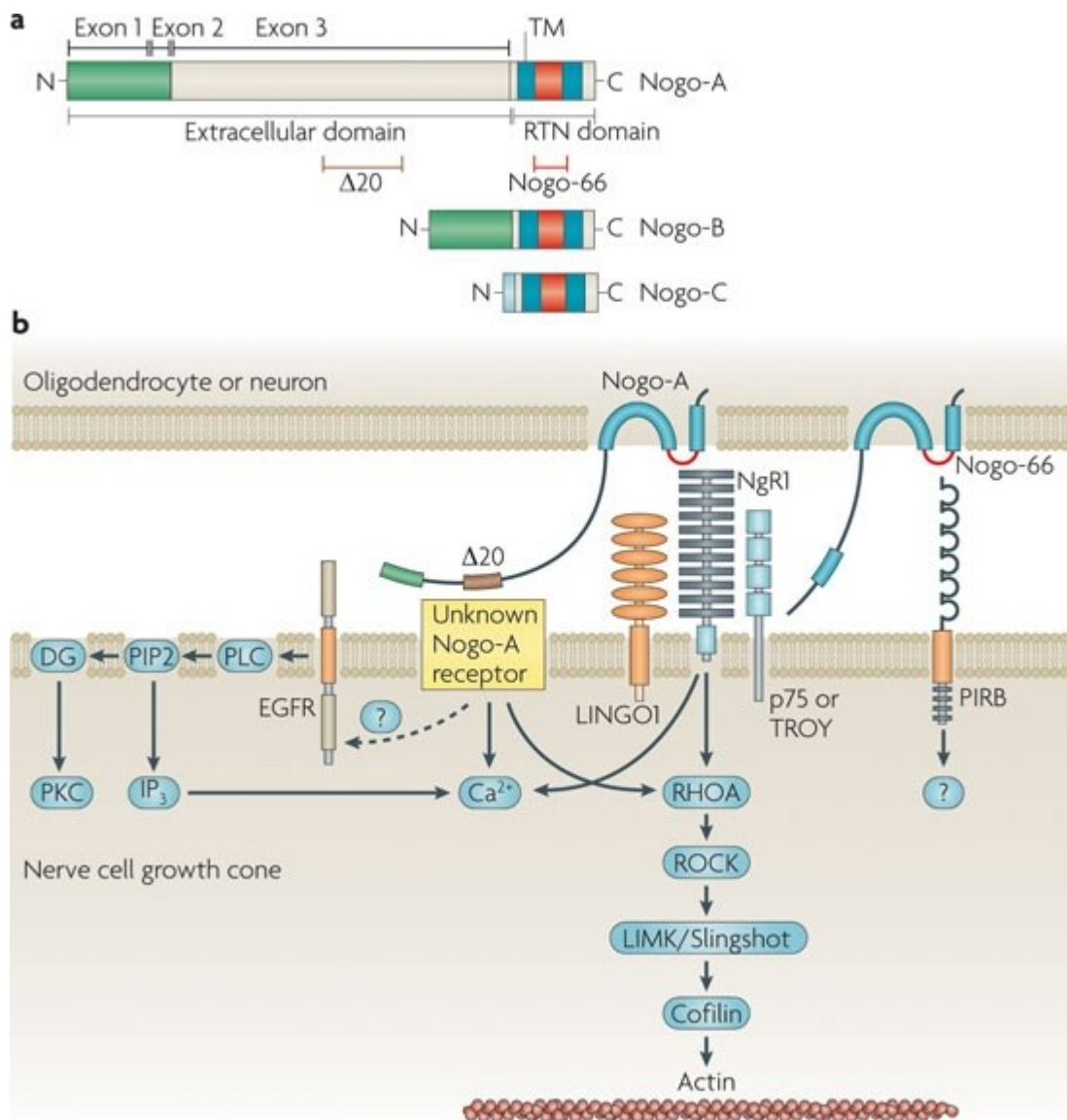
In reversen Transplantationsexperimenten stoppten allerdings Axone des peripheren Nervensystems ihr Wachstum in zentralnervösem Gewebe (Stoll et al. 2002). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass läsionierte Axone des zentralen Nervensystems nach der Schädigung auch ohne eine externe Einwirkung wieder für eine kurze Distanz aussprossen können (Li und Raisman 1994). Jedoch kam es regelmäßig zum Wachstumsstillstand in der Nähe der Läsionsstelle (Stichel und Müller 1994).

Neurone des zentralen Nervensystems scheinen demzufolge bis in das mature und postmitotische Stadium eine innere Kapazität zur Regeneration beizubehalten. Diese bahnbrechenden Studienergebnisse führten zu der Vermutung, dass lokal extrinsische Einflüsse im Läsionsgebiet das entscheidende Hindernis für auswachsende Axone des zentralen Nervensystems darstellen. Bis zum heutigen Tag ist ungeklärt, warum auswachsende Axone des zentralen Nervensystems nicht oder nur eingeschränkt in der Lage sind, über eine Läsion hinweg zu regenerieren. Es werden mehrere Hypothesen für extrinsische Ursachen des Regenerationsdefizites diskutiert:

#### Die Anwesenheit inhibitorischer Moleküle im Gewebe des zentralen Nervensystems:

Die Arbeitsgruppe um M. E. Schwab konnte 1988 erstmals zeigen, dass das von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem gebildete Myelin das Auswachsen von Axonen verhindert (Caroni und Schwab 1988b, Savio und Schwab 1989). Die Isolierung eines inhibitorischen Myelinproteins, dem Nogo-A, und die Herstellung eines das Epitop spezifisch und funktionell neutralisierenden Antikörpers (IN-1; monoclonal antibody raised against neurite growth inhibitors) folgten (Schwab 2004). IN-1 konnte die hemmende Wirkung von Nogo-A *in vitro* und *in vivo* nach einer Läsion teilweise antagonisieren. Das Myelin-spezifische Protein kommt in den drei Isoformen Nogo-A, Nogo-B und Nogo-C vor, die sich in ihrer Topologie unterscheiden (Abbildung 1a). Allen Isoformen gemeinsam ist eine 66 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, die Nogo-66 genannt wird (Chen et al. 2000, GrandPre et al. 2000, Prinjha et al. 2000). Ausschließlich Nogo-A ist im zentralen Nervensystem inhibitorisch aktiv und kommt vorwiegend in Oligodendrozyten vor, in denen es entweder auf der Oberfläche oder am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Durch Expression von Nogo-A auf der innersten, axonalen Myelinhülle des Oligodendrozyten erfolgt der axonal-oligodendrogliale Signalaustausch (Huber et al. 2002, Wang et al. 2002a). Die Proteinstruktur von Nogo-A ist detailliert untersucht, seine dominante Lokalisation auf Oligodendrozyten und Myelinscheiden charakterisiert und signalvermittelnde Rezeptorkomplexe konnten identifiziert werden ((Fournier et al. 2001, Mi et al. 2004, Park et al. 2005, Schwab 2010, Shao et al. 2005, Wang et al. 2002b, Wang et al. 2002a); Abbildung 1). Mit der Identifizierung des MAG (Myelin-assoziierte Glykoprotein), des MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) und des OMgp (Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein) wurden im Weiteren zusätzliche Myelin-assoziierte wachstumshemmende Proteine charakterisiert. Alle vier Proteine wirken unter anderem über den Nogo-Rezeptor (NgR1), der die Signalübertragung in das Zellinnere vermittelt und in deren Folge die Wachstumskegel der Axone kollabieren (Fournier et al. 2001). Der Nogo-Rezeptor ist über

einen Lipidanker an die Membran der Nervenzelle gebunden und kann den wachstumsinhibierenden Effekt nur im Zusammenspiel mit Ko-Rezeptoren in das Zytosol des Neurons vermitteln. Als mögliche Ko-Rezeptoren sind LINGO1 (LRR and Ig domain-containing Nogo-receptor-interacting protein), der Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR) sowie der p75 verwandte Rezeptor TROY/TAJ (tumor necrosis factor receptor superfamily) beschrieben (Fournier et al. 2001, Mi et al. 2004, Park et al. 2005, Shao et al. 2005, Wang et al. 2002b). Die Informationsübertragung in das Zellinnere löst eine Signalkaskade über die membrangebundene GTPase RhoA aus, die das Kollabieren des Wachstumskegels zur Folge hat (Fournier et al. 2001, Fournier et al. 2003, Park et al. 2005, Shao et al. 2005). Dieser Kaskade wird eine entscheidende Rolle in der Regulation neuronalen Wachstums zugeschrieben (Abbildung 1b und 2). So ist p75NTR zusammen mit dem Nogo-Rezeptor und LINGO1 in der Lage einen dreiteiligen Rezeptorkomplex auszubilden, der wachstumsinhibierende Faktoren des zentralen Nervensystems, wie Nogo-A, MAG und MOG bindet (Barker 2004, Kalb 2005).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen Myelin-assoziiierter Wachstumsinhibitoren im zentralen Nervensystem (Schwab 2010).**

**1a:** Struktur der drei Hauptisoformen des Myelin-spezifischen Proteins Nogo (Nogo-A, Nogo-B und Nogo-C) mit ihren funktionellen Domänen. Allen Isoformen gemeinsam ist die Nogo-66 Sequenz.

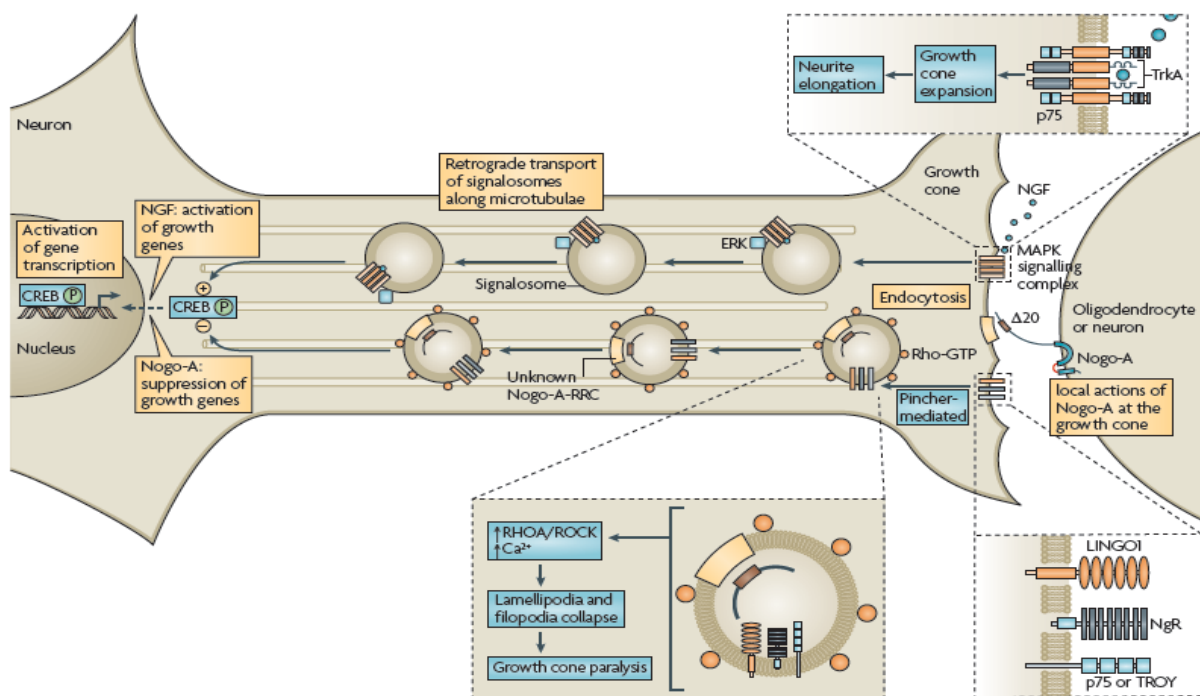
**1b:** Ausschließlich Nogo-A inhibiert das axonale Wachstum im zentralen Nervensystem. Dieser neuriteninhibierende Effekt wird über die Bindung der Nogo-66 Domäne an den Nogo-Rezeptor (NgR1) und die Bindung an transmembranäre Ko-Rezeptoren (LINGO1, p75 und TROY) vermittelt, welche zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen. Der Signalvermittlung über die membrangebundene GTPase RhoA folgen die Destabilisierung des Actinzytoskelettes und der Kollaps des Wachstumskegels.

### Das Fehlen neurotropher Faktoren im Gewebe des zentralen Nervensystems:

Neurotrophe Faktoren sind Signalstoffe, die die Differenzierung, das Überleben und die Regeneration von Nervenzellen regulieren. Durch exogene Applikation von neurotrophen Faktoren hat man in zahlreichen Studien versucht, das Überleben von axotomierten retinalen Ganglienzellen und deren axonale Regeneration zu stimulieren (Logan et al. 2006, Weise et al. 2000). Neurotrophe Faktoren werden von Neuronen und Gliazellen, aber auch von T-Zellen und Muskelzellen synthetisiert und wirken sowohl auf Neurone als auch auf nicht-neuronale Zellen. Dabei kann ihre Wirkungsweise Zielzell-vermittelt, parakrin oder autokrin sein. Sie lassen sich in drei Untergruppen einteilen: die Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5), die neuropoetischen Zytokine (CNTF, IL-6) sowie die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Im Folgenden wird hauptsächlich auf die Untergruppe der Neurotrophine eingegangen.

Neurotrophine sind endogene Polypeptide mit einer großen Strukturhomologie, die die Entwicklung, Differenzierung und Plastizität des Nervensystems sowie das Überleben von zentralen Nervenzellen steuern. Während diese Moleküle in frühen Entwicklungsstadien hauptsächlich die neuronale Vernetzung des Nervensystems regulieren, sind sie in späteren Phasen der Entwicklung sowie im adulten Zustand maßgeblich am Überleben und am Schutz von Nervenzellen beteiligt (Lindsay et al. 1993). Die Schädigung eines Nervs führt im zentralen Nervensystem zu einer Unterbrechung der Versorgung der Nervenzelle mit neurotrophen Faktoren. Wachstumsgerichtete Stoffwechselvorgänge werden gestört, in deren Folge der Axonstumpf distal der Läsionsstelle der Wallerschen Degeneration unterliegt und proximal dem retrograden Zelltod mit anschließender Phagozytose durch Immunzellen. Die retrograde Degeneration ist ein Mechanismus der Apoptose und von der Art der Verletzung und dem Abstand der Zellsomata zur axonalen Läsionsstelle abhängig (Herdegen et al. 1997). Je weiter entfernt sich die Verletzung vom Zellsoma befindet, desto wahrscheinlicher ist das zelluläre Überleben. Apoptose und Regeneration stehen dabei in einem paradoxen Zusammenhang. Zellen, in denen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen die höchste Apoptoserate beobachtet wurde, zeigten das höchste Regenerationspotential der Axone (Herdegen et al. 1997). Neurotrophine können nicht nur einer Degeneration entgegenwirken, sondern auch Regeneration nach einer Verletzung herbeiführen. An einem *in vitro* Modell retinaler Ganglienzellen wurde nachgewiesen, dass die Neurotrophine sowohl axonales als auch dendritisches Wachstum stimulieren (Cohen et al. 1994, Goldberg et al. 2002, Sawai et al. 1996). Auch *in vivo* konnte ein Neurotrophin-vermittelter, fördernder Einfluss auf regeneratives axonales Wachstum nach einer Rückenmarksläsion nachgewiesen werden.

Wurden zudem die Myelin-assoziierten Hemmstoffe durch den Antikörper IN-1 blockiert, fand Regeneration sogar über lange Distanzen statt (Bregman et al. 1997, Schnell et al. 1994). Neurotrophine werden in den entsprechenden Zielgebieten in geringer Konzentration ausgeschüttet und regulieren so die Anzahl der innervierenden Neurone (Oppenheim et al. 1992). An Axonterminalen von Neuronen, die in dieses Gewebe projizieren, werden die Neurotrophine über ihren Rezeptor gebunden, internalisiert und retrograd zum Wirkungsort, dem Zellkern, transportiert. Jedes Neurotrophin weist dabei ein individuelles, zeitliches und populationsabhängiges Wirkungsspektrum auf. Die Wirkung der Neurotrophine wird über zwei Klassen von Rezeptoren, die sich hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität unterscheiden, vermittelt (Chao et al. 1998). Zur ersten Klasse zählen Rezeptoren mit Tyrosinkinase- (trk)- Aktivität, welche eine hohe Affinität zu dem jeweiligen Neurotrophin besitzen. Die Bindung der Neurotrophine an ihren spezifischen trk-Rezeptor führt zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer Domänen, die eine Aktivierung von Signalmolekülen, wie zum Beispiel der Phospholipase C und PI3-Kinase, zur Folge haben. Die weitere Signalkaskade beeinflusst letztendlich die zelluläre Gentranskription und Proteinsynthese (Greene und Kaplan 1995). Zur zweiten Klasse von Rezeptoren gehört der Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR), der zu der Familie der Tumornekrosefaktoren gehört und alle Neurotrophine unspezifisch bindet (Barbacid 1995). Der intrazelluläre Signalweg der Neurotrophin-vermittelten Effekte im Wachstumskegel ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung intrazellulärer Signalwege und Effekte von Neurotrophinen (NGF) und Nogo-A auf regenerierende Axone des zentralen Nervensystems (Schwab 2010).

### Die Ausbildung einer physikalischen Barriere an der Läsionsstelle:

Neben den inhibitorischen Myelinproteinen stellt die Ausbildung einer glösen Narbe als physikalische und chemische Barriere eine Ursache der Wachstumsrestriktion im zentralen Nervensystem dar. Die Narbe besteht aus Fibroblasten, Mikroglia und reaktiven Astrozyten, die weitere wachstumshemmende Stoffe, insbesondere nonpermissive, extrazelluläre Matrixproteine produzieren (Fawcett und Asher 1999). Hierbei werden als wachstumshemmende Faktoren für aktivierte Mikroglia TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und Stickstoffmonoxid diskutiert. Zu den von reaktivierten Astrozyten exprimierten inhibitorischen Molekülen zählen Tenascin, CD44 und Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG), wie zum Beispiel Versican und Brevikan (Asher et al. 2001, Fawcett und Asher 1999, Zimmermann und Dours-Zimmermann 2008). Die astrozytäre Überexpression des zytoskelettalen Proteins GFAP (glial fibrillary acidic protein) bewirkt die Ausbildung einer für neu regenerierte Axone unüberwindbaren mechanischen Barriere und damit die Abschottung des verletzten Nervengewebes. Über tight junctions und gap junctions wird darüber hinaus der Stoffaustausch mit Oligodendrozyten, Mikroglia und Makrophagen verhindert (Fawcett und Asher 1999).

Neben den extrinsischen inhibitorischen Faktoren, die in der lokalen Umgebung der verletzten Nervenzellen produziert werden, kommen auch intrinsischen Faktoren der Nervenzelle eine wesentliche Rolle bei der Regulation axonaler Wachstumsprozesse zu. Als intrinsische Faktoren werden intrazelluläre Signalwege, deren molekulare Komponenten sowie die darüber gesteuerte Regulation von Zielgenen verstanden, welche die Entscheidung über das Überleben versus Apoptose und über die Regeneration versus Wallersche Degeneration von Neuronen und Axonen kontrollieren.

Als wichtige intrinsische Faktoren sind die wachstumsassoziierten Proteine (GAPs: growth associated proteins) mit ihrem bekanntesten Mitglied GAP-43 (growth associated protein-43) zu nennen (Benowitz und Routtenberg 1997). Während GAP-43 in der Entwicklung des zentralen Nervensystems in den Wachstumskegeln fast aller wachsenden Nervenfasern exprimiert wird (Skene 1989), beschränkt sich seine Expression im adulten Gehirn auf den Hippocampus und den zerebralen Kortex (Strittmatter et al. 1992).

Eine Induktion der GAP-43 Expression wird bei erfolgreicher Regeneration *in vitro* und *in vivo* insbesondere in den Wachstumskegeln und den wachstumsaktiven Endigungen der Axone beobachtet, während umgekehrt schlechtes Wachstum mit einer fehlenden neuronalen Induktion der GAP-43 Expression korreliert. Spontane axonale Wachstumsprozesse konnten in adulten GAP-43 überexprimierenden Mäusen im Hippocampus und im Rückenmark

gefunden werden (Aigner et al. 1995). Funktionell mit den GAPs assoziiert sind zytoskelettale Proteine wie Actin und Tubulin sowie der Transkriptionsfaktor c-Jun (Herdegen et al. 1997). Dass Nervenzellen intrinsische wachstumsfördernde Moleküle besitzen, wird durch die Tatsache bekräftigt, dass embryonale Neurone ein stärkeres Wachstumsverhalten als postnatale oder adulte Nervenzellen zeigen (Davies 1993, Davies 1994). Goldberg et al. konnten in dissoziierten Retinakulturen nachweisen, dass Axone embryonaler retinaler Ganglienzellen (E20) eine zehnmal höhere Wachstumsrate als die von postnatalen retinalen Ganglienzellen (P8) aufweisen (Goldberg et al. 2002). Ebenso konnte in *in vivo* Studien die Altersabhängigkeit der Regenerationsfähigkeit demonstriert werden (Shewan et al. 2002, Li et al. 1995). Die regenerative Kapazität nimmt in der frühen postnatalen Periode ab, wobei verschiedene Faktoren hierfür verantwortlich gemacht werden. Zum einen trägt die Abnahme beziehungsweise der Verlust an intrinsischen wachstumsassoziierten Molekülen, wie dem GAP-43 Protein, zur Abnahme der Regenerationsfähigkeit im adulten zentralen Nervensystem bei (Strittmatter et al. 1992, Skene 1989). Zum anderen steht dieser Zeitraum der zunehmenden Wachstumsrestriktion in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit der Entwicklung von Oligodendrozyten, Astrozyten und Myelin – das heißt mit der Veränderung des extrinsischen Milieus. Wurde die Struktur des Myelins derart verändert, dass der Beginn der Myelinisierung verzögert erfolgte, war Regeneration noch zu einem Zeitpunkt möglich, an dem unter physiologischen Bedingungen kein Auswachsen von Fasern nach einer Rückenmarksläsion mehr beobachtet wurde (Keirstead et al. 1995). Die Expression von wachstumshemmenden Proteinen wie Nogo-A steigt ebenfalls im gleichen Zeitfenster an. Durch deren Blockierung mit dem IN-1 Antikörper konnte die altersabhängige Abnahme der Regenerationsfähigkeit bei Rückenmarksläsionen von Säugetieren *in vitro* überwunden werden (Varga et al. 1995).

Es wird deutlich, dass die intrinsischen und extrinsischen Faktoren zwar unabhängig voneinander reguliert werden, jedoch der komplexen Gesamtwirkung eine Interaktion zwischen intrinsischen und extrinsischen Faktoren zugrunde liegt. Eine entwicklungsabhängige Synthese aus permissiven und restriktiven zellintrinsischen und extrinsischen Regulatoren scheint das Wachstumsverhalten der Axone zu bestimmen. Während der Entwicklung ist diese Balance zugunsten der fördernden Faktoren verschoben, so dass plastisches Nervenfasernwachstum und Regeneration beobachtet werden. Im adulten zentralen Nervensystem dominieren die hemmenden Faktoren, deren Balance nach einem Trauma in Richtung Wachstumsförderung verschoben werden kann.



Mechanistisch kann davon ausgegangen werden, dass das Regenerationspotential verletzter Nervenzellen im adulten zentralen Nervensystem von extrinsischen inhibitorischen und intrinsischen stimulierenden Faktoren abhängig ist. Es leitet sich die Vermutung ab, dass die axonale Regeneration adulter Nervenzellen durch gezielte Manipulation dieser Faktoren positiv beeinflusst werden kann.

## **2.2. Apoptose**

Dem intrinsischen Regulationsprogramm zugehörig, bezeichnet die Apoptose den programmierten Tod einer Zelle. Der Vorgang der Apoptose ist ein streng regulierter energieabhängiger Prozess (Kerr et al. 1972).

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle beginnen mit dem Schrumpfen der Zelle, der Ausstülpung der Zelloberfläche und einer Kondensation des Chromatins im Zellkern. Die DNA der betroffenen Zelle wird fragmentiert, membranumgebende Abschnürungen der Zelle („apoptotic bodies“) werden gebildet und von benachbarten Makrophagen aufgenommen. Biochemisch ist der programmierte Zelltod ein induzierbarer, energieverbrauchender ATP-abhängiger Vorgang gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese.

Die Apoptose ist eindeutig von der Zellnekrose zu unterscheiden, bei der es zu einer Beeinträchtigung der Homöostase und zu einer Störung des Ionenhaushaltes kommt. Es resultiert eine Zellschwellung mit Verlust der Membranintegrität und anschließender Zelllyse. Eine begleitende lokale entzündliche und immunologische Reaktion wird durch die Zellinhaltsstoffe ausgelöst.

Es sind verschiedene Signaltransduktionswege bekannt, über die Apoptose ausgelöst werden kann. Wie in Abbildung 3 dargestellt, soll im Folgenden auf die beiden Hauptmechanismen, den extrinsischen Weg über „Todesrezeptoren“ und den intrinsischen mitochondrialen Weg eingegangen werden (Budd 2001). An beiden Signalkaskaden sind Caspasen (cysteine aspartate-specific proteases) entscheidend beteiligt; um den Mechanismus der Apoptose verstehen zu können, werden zuerst die Caspasen vorgestellt.

### **2.2.1. Caspasen: Exekutoren der Apoptose**

Caspasen bilden die Enzymfamilie der Cystein-Proteasen, welche über ein Cystein-Molekül in ihrem aktiven Zentrum und ihre Fähigkeit, Substrate spezifisch nach Aspartat zu spalten, charakterisiert sind (Earnshaw et al. 1999). Sie liegen als inaktive Pro-Caspasen vor und

werden autoproteolytisch, meist durch andere vorgeschaltete Caspasen, gespalten und somit aktiviert (Thornberry 1999). Funktionell werden drei Gruppen unterschieden: Die Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9 und -10), die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) und die Reminder-Caspasen (Caspase-1, -4 und -5). Nach Aktivierung der Initiator-Caspase kommt es über eine Caspasenkaskade zur Aktivierung der eigentlichen Effektor-Caspasen. Diese spalten schließlich eine Vielzahl von nukleären und zytosolischen Proteinen, ein Prozess, der zu den typischen morphologischen Veränderungen der Zelle führt, die die Apoptose charakterisieren (Earnshaw et al. 1999).

### **2.2.2. Extrinsischer Signalweg über Todesrezeptoren**

Die Induktion des Zelltodes wird beim extrinsischen Signalweg durch transmembranäre Rezeptoren, sogenannte „Todesrezeptoren“, wie zum Beispiel Apo-1/Fas, vermittelt. Die Bindung der dazugehörigen Liganden, beispielsweise Mitglieder der TNF-Superfamilie, induziert die Formierung des DISC (death-inducing signalling complex) Multiproteinkomplexes. Dieser Komplex fördert über Adaptermoleküle, wie zum Beispiel der FADD (Fas associated death domain), die Aktivierung der Initiator-Caspase-8, wodurch Procaspase-3 geschnitten und aktiviert wird (Krammer 2000). Dadurch wird das Apoptosesignal vervielfältigt und führt zu den charakteristischen Zellveränderungen (Abbildung 3). Daneben wird durch die Caspase-8 das Protein Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, gespalten. Es aktiviert den mitochondrial-vermittelten Weg, verbindet somit den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg und verstärkt das apoptotische Signal (Li et al. 1998).

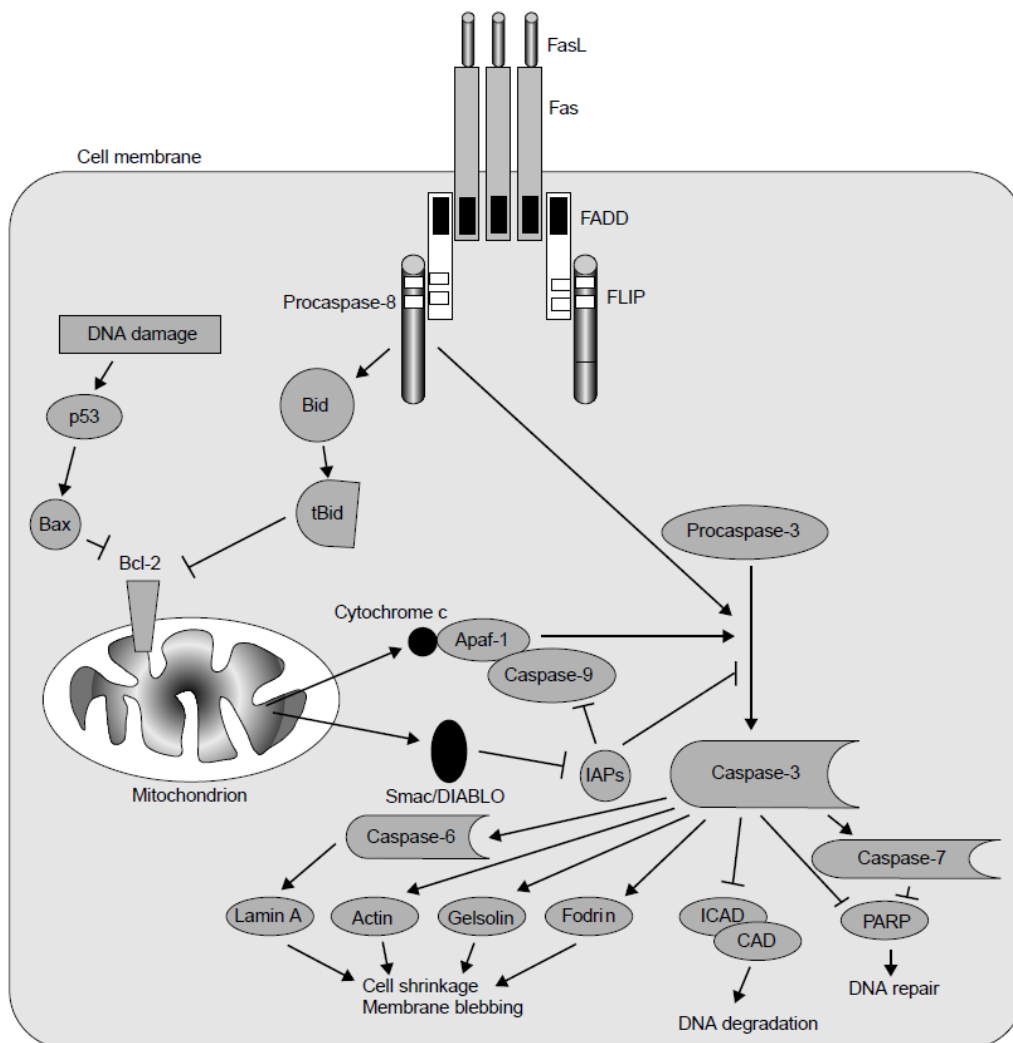
### **2.2.3. Intrinsischer mitochondrialer Weg**

Der zweite, der mitochondrial-vermittelte oder intrinsische Signalweg wird hauptsächlich als Reaktion auf extra- oder intrazelluläre Stressereignisse aktiviert (Ravagnan et al. 2002). Er wird entscheidend durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert und beinhaltet die Aktivierung der Caspase-9 in einem multimeren Komplex.

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, durch DNA-Schäden oder andere extra- und intrazelluläre Stressereignisse kommt es zum Efflux der Apoptosemediatoren, wie zum Beispiel von Cytochrom C, dATP und AIF (apoptosis inducing factor), aus den Mitochondrien und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Budd 2001, Pinton et al. 2008). Dieser Efflux wird vermutlich durch die Dysregulation antiapoptotischer Funktionen von Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> ermöglicht und/oder ist auf die Aktivierung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax und Bad,

zurückzuführen. Das freigesetzte Cytochrom C bindet an das zytosolische Protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) und Procaspase-9. Dieser Komplex bildet das Apoptosom und setzt die aktivierte Initiator-Caspase-9 frei. Caspase-9 schneidet Procaspase-3, -6 und -7, welche die charakteristischen apoptotischen Zellveränderungen vermitteln (Abbildung 3).

Gegenspieler der Caspasen und somit der Induktion der Apoptosesignalkaskade sind die Proteine der IAP-Familie (inhibitors of apoptosis protein family), welche sowohl die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 als auch der Effektor-Caspase-3 hemmen können. Das mitochondriale Protein Smac/DIABLO, dessen Freisetzung durch Proteine der Bcl-2-Familie stimuliert werden kann, interagiert wiederum mit den IAPs und antagonisiert deren antiapoptotische Wirkung (Srinivasula et al. 2001).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion extrinsisch und intrinsisch vermittelter Apoptose (Budd 2001).**

Sowohl der rezeptorinduzierte als auch der mitochondriale Weg führen unter anderem zur Aktivierung von Caspase-3, was die Proteolyse einer Reihe apoptotischer Substrate und die Degradierung der Zelle zur Folge hat.

### 2.3. Die Bcl-2-Proteinfamilie

Wichtige Regulatoren der Apoptose sind die Proteine der B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) Familie, von der sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Mitglieder bekannt sind und die sowohl als zytosolische als auch als membrangebundene Proteine vorkommen. Sie zeichnen sich durch die Verteilung von vier homologen Regionen, den BH1-4-Domänen (Bcl-2 homology region), aus. Basierend auf Strukturähnlichkeiten und funktionellen Kriterien werden die Mitglieder der Bcl-2-Familie in drei Gruppen eingeteilt.

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-w) enthalten vier Homologiedomänen (BH1-4), die für ihre antiapoptotische Wirkung unerlässlich sind (Yin et al. 1994). Dabei bilden die Domänen BH1-3 eine hydrophobe Tasche, die durch die Rückseite der BH4-Domäne stabilisiert wird (Muchmore et al. 1996). Über diese hydrophobe Tasche werden die BH3-Domänen (= hydrophobe  $\alpha$ -Helix) anderer Proteine gebunden (Sattler et al. 1997). Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine sind als „tailed-anchored“ Proteine in den intrazellulären Membranen der äußeren Mitochondrienmembran, dem endoplasmatischen Retikulum und der äußeren Kernmembran über einen lipophilen C-Terminus inseriert (Nguyen et al. 1993). Durch diese membrangebundene Lokalisation bringen die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie andere an der Apoptose beteiligte Proteine durch Bindung der jeweiligen BH3-Domäne aus dem Zytoplasma an die Membran der Zellorganellen.

Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie werden durch die Gruppe der „Bax-artigen“ Proteine mit drei Homologiedomänen (BH1-3) und die Gruppe der „BH3-only“ Proteine unterteilt. Zu den wichtigsten Vertretern der proapoptotischen Proteine gehören Bax, Bcl-Xs und Bad (Boise et al. 1993, Oltvai et al. 1993). Als klassischer Vertreter der proapoptotischen Bcl-2-Proteine liegt Bax im physiologischen Zustand intrazellulär als zytoplasmatisches Monomer vor. Die hydrophobe  $\alpha$ -Helix ist in der aus BH1-3 gebildeten hydrophoben Tasche maskiert und für eine Bindung unzugänglich. Intrazelluläre Stresssignale modifizieren die Formation der BH1-3-Domänen, so dass die BH3-Domäne von Bax zugänglich wird, oligomerisiert und an der Mitochondrienmembran inserieren kann (Adams und Cory 2001). Die Integrität der Mitochondrienmembran wird verletzt und Proteine des Intramembranspaltes, wie Cytochrom C, werden ins Zytoplasma freigesetzt. Diese Beispiele belegen, dass eine wichtige Funktion der Bcl-2-Familie die Regulation der mitochondrialen Membranpermeabilität und die Abgabe proapoptotischer mitochondrialer Faktoren,

beispielsweise Cytochrom C, ins Zytoplasma darstellt (Budd 2001). Als vermittelnde Mechanismen werden verschiedene Hypothesen diskutiert:

#### Bildung von Poren:

Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Bcl-X<sub>L</sub> und bakteriellen, porenbildenden Toxinen, dem Diphtherietoxin und Colchicin, werden Poren in der Membran der Mitochondrien formiert. Im Sinne der Ausbildung eines Ionenkanals werden einerseits der Efflux von Ionen, das Membranpotential der Mitochondrienmembran und damit die Homöostase reguliert. Andererseits kann durch die Porenformation ein direkter Efflux von proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom C und AIF, vermittelt werden (Muchmore et al. 1996, Reed 1997). Dies kann direkt, aber auch indirekt durch den Einfluss auf mitochondriale Membranproteine, beispielsweise dem PTP Komplex (permeability transition pore complex), vermittelt werden (Loeffler und Kroemer 2000).

#### Heterodimerisierung zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen:

Die homologen Domänen ermöglichen die Homo- oder Heterodimerisierung, wodurch pro- und antiapoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie funktionell miteinander agieren können (Korsmeyer et al. 1993). Dies kann zu einer gegenseitigen Neutralisierung führen. Eine Di- oder Oligomerisierung zwischen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen im Sinne einer Wirkungsverstärkung ist nicht möglich, da die zur Bindung notwendige BH3-Domäne einen Teil der hydrophoben Tasche darstellt (Conus et al. 2000).

#### Direkter Einfluss auf die Aktivierung von Caspasen:

Durch Heterodimerisierung mit dem Apoptosom oder durch direkte Bindung von Caspase-1 und -8 kann die durch Caspase-9 vermittelte Apoptosekaskade durch Bcl-X<sub>L</sub> inhibiert werden (Chinnaiyan et al. 1997, Hu et al. 1998).

Für die Regulierung der Bcl-2-Proteine existieren zahlreiche Beispiele (Isenmann et al. 2003). Sehr gut untersucht ist die negative Regulation des Bcl-2 Proteins durch Bad. Unter physiologischen Bedingungen führt die Stimulation durch Wachstumsfaktoren zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges. Die Phosphorylierung von proapoptotischem Bad führt zu dessen Bindung an das zytosolische Protein 14-3-3. Damit wird die Anlagerung an die Mitochondrienmembran inhibiert (Datta et al. 1997).

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren entfällt diese Phosphorylierung, Bad kann an das mitochondrial-verankerte Bcl-2 binden und inhibiert dessen antiapoptotische Wirkung. Ähnliche Effekte hat der MAP-Kinase ERK 1/2 Signaltransduktionsweg (Zhang et al. 2003).

Erk 1/2 beeinflusst die Bindung von Bax an die Mitochondrienmembran und die Phosphorylierung von Bim.

### 2.3.1. Bcl-X<sub>L</sub>

Ein besonderes Mitglied der Bcl-2-Familie stellt Bcl-X<sub>L</sub> dar. Bcl-X<sub>L</sub> ist eine Isoform des Bcl-X Gens und entsteht durch alternatives Spleißen. Aus dem Primärtranskript können zwei Spleißprodukte mit entgegengesetzter Aktivität gebildet werden, die als Bcl-X<sub>L</sub> (long; antiapoptotisch) und als Bcl-X<sub>S</sub> (short; proapoptotisch) beschrieben sind (Boise et al. 1993, Fang et al. 1994, Gonzalez-Garcia et al. 1995). Außerdem wurden die Spleißvarianten Bcl-X<sub>ΔTM</sub> und Bcl-X<sub>β</sub> identifiziert, über deren Funktion bisher nichts Genaueres bekannt ist (Grillot et al. 1997).

Das Protein Bcl-X<sub>L</sub> mit 233 Aminosäuren hat mit 39,9 % die größte Sequenzhomologie im Vergleich zu Bcl-2 (Rautureau et al. 2010). Das kleinere Transkript, Bcl-X<sub>S</sub>, kodiert für ein Protein mit 170 Aminosäuren; ihm fehlen 63 Aminosäuren, in denen die BH1- und BH2-Domänen liegen (Boise et al. 1993). Durch eine Serie von Mutationen in den BH1- und BH2-Domänen von Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> konnte gezeigt werden, dass diese Domänen für die Heterodimerisierung mit Bax benötigt werden und für die antiapoptotische Funktion des Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> Proteins wichtig sind (Oltvai et al. 1993). In der Zelle ist der Hauptanteil von Bcl-X<sub>L</sub> auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und ein geringerer Anteil am endoplasmatischen Retikulum, der Kernhülle und im Zytosol (Gonzalez-Garcia et al. 1994, Motoyama et al. 1998). An den Mitochondrien inhibieren Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2 sowohl den apoptotischen (Boise und Thompson 1997) als auch den nekrotischen Zelltod durch die Stabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials (Shimizu et al. 1996). Durch Bindung an Cytochrom C inhibieren sie dessen Freisetzung in das Zytosol und damit die Aktivierung von Apaf-1 und der darauf folgenden Caspase-Kaskade (Kharbanda et al. 1997).

Proteine der Bcl-2-Familie werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert und sind in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, zum Beispiel der hypoxischen Zellschädigung im Rahmen von Durchblutungsstörungen im Myokard und Gehirn, der unkontrollierten Proliferation und Tumorentstehung oder bei Autoimmunerkrankungen, involviert. In knockout-Experimenten an Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> defizienten Mäusen wurde ihre fundamentale Rolle für die Zellvitalität deutlich belegt (Motoyama et al. 1995, Veis et al. 1993). Die embryonale Entwicklung von Bcl-2 defizienten Mäusen ist normal. Jedoch sterben sie in den ersten Wochen nach der Geburt an den Folgen eines terminalen Nierenversagens und einer ausgeprägten Involution des Immunsystems. Der konstitutive, Bcl-X<sub>L</sub> defiziente Phänotyp ist

dagegen bereits *in utero* durch einen massiven Zelluntergang im zentralen Nervensystem und dem frühen hämatopoetischen System letal. Untersuchungen von Gonzalez-Garcia konnten die Expression von Bcl-X<sub>L</sub> in langlebigen, postmitotischen Gehirnzellen und die Bedeutung des Proteins für den Erhalt neuronaler Lebensfähigkeit nachweisen (Gonzalez-Garcia et al. 1995). Durch Bcl-X<sub>L</sub> vermittelte neuroprotektive Effekte sind nach traumatisch, hypoxisch und metabolisch induzierter Zellschädigung in adulten Neuronen beobachtet worden (Cao et al. 2002, Parsadanian et al. 1998, Shinoura et al. 2000).

## 2.4. Die Schädigung des Nervus opticus als experimentelles Läsionsmodell

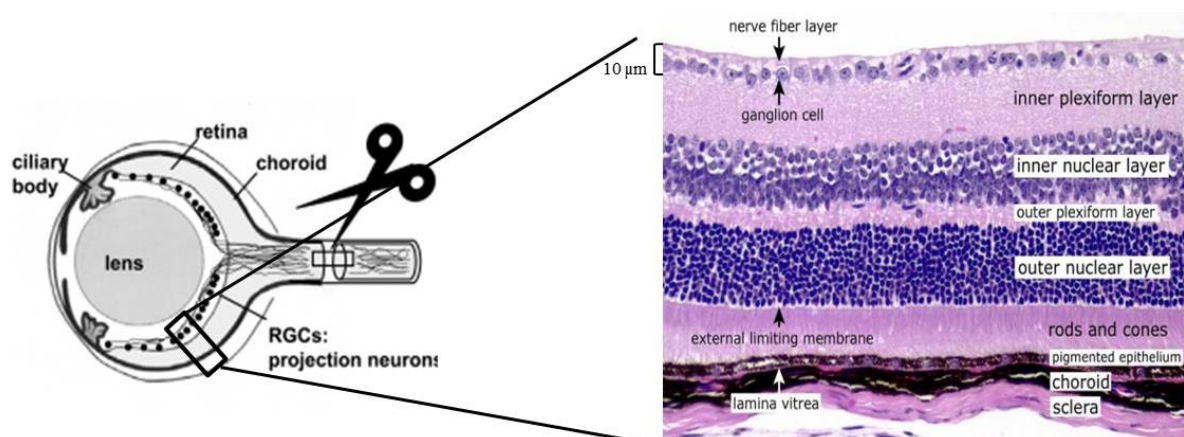
Die Untersuchungen des Effektes von Bcl-X<sub>L</sub> auf das Überleben und die Regeneration von retinalen Ganglienzellen wurden in der hier vorgelegten Studie an Netzhautgeweben sowie am Nervus opticus, der sich aus den Axonen retinaler Ganglienzellen zusammensetzt, von transgenen Bcl-X<sub>L</sub> neuronal überexprimierenden Mäusen (Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup>) sowie Kontrolltieren durchgeführt. Dabei ist die Retina ein gut etabliertes Modell für neurobiologische Fragestellungen, da sie strukturell, morphologisch und funktionell gut charakterisiert und experimentell leicht zugänglich ist.

Zahlreiche tierexperimentelle Studien zur Neuroprotektion, Regeneration und funktionellen Wiederherstellung belegen verschiedene Vorteile, die das Läsionsmodell des Nervus opticus bietet. Hierzu gehört die klare anatomische Identifizierbarkeit der läsionierten Neurone, den retinalen Ganglienzellen (RGZ), und der axonalen Zielgebiete, dem Colliculus superior (SC) und dem Corpus geniculatum laterale (LGN) sowie der retinotectalen Faserprojektion, dem Nervus und Tractus opticus (ON). Es kann eine kontrollierte Schädigung im Sinne einer kompletten Faserdurchtrennung erfolgen, ohne zusätzlich umgebendes Hirngewebe zu verletzen. Das Läsionsmodell des Nervus opticus ermöglicht zudem eine induzierte apoptotische Degeneration von Nervenzellen, ohne dabei die Somata selbst zu verletzen. Mit einem Apoptosemaximum in den ersten ein bis zwei Wochen kommt es in diesem Zeitraum zum retrograden Verlust von etwa 80 bis 90 % der retinalen Ganglienzellen (Sabel et al. 1995, Sautter und Sabel 1993). Die Läsion an der Retina wird in dieser Arbeit als ein Modell für eine projektionsspezifische akute Schädigung des zentralen Nervensystems eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Läsionsmodells und der Struktur der Retina ist in Abbildung 4, der neuroanatomische Aufbau des retinotectalen Systems in Abbildung 5 wiedergegeben.

Innerhalb der Retina organisieren sich sechs verschiedene Neuronentypen und ihre Axonfortsätze in leicht voneinander abgrenzbaren Schichten. In der äußersten, der Glaskörper

abgewandten äußeren nukleären Schicht (outer nuclear layer; ONL), befinden sich die Somata der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), deren Außensegmente an den nichtneuronalen Teil der Retina, dem Pigmentepithel, angrenzen. Auf der Innenseite der äußeren nukleären Schicht schließt sich die äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer; OPL) mit den Axonterminalen der Photorezeptoren zu den Dendriten der Bipolarzellen und den Fortsätzen der Horizontalzellen an. Die Somata der Horizontal-, Amakrin- und Bipolarzellen sind in der inneren nukleären Schicht (inner nuclear layer; INL) lokalisiert. Das Signal wird anschließend aus dieser Schicht über die innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer; IPL) an den Dendritenbaum der retinalen Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (ganglion cell layer; GCL) weitergeleitet, deren Axone die Nervenfaserschicht (nerve fiber layer; NFL) bilden (Abbildung 4).

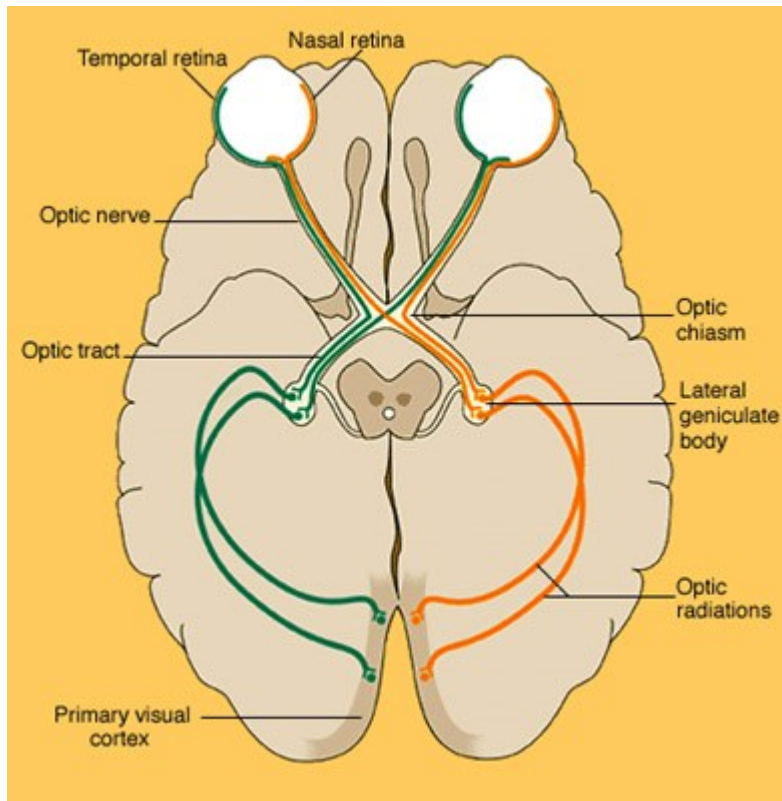
Die Axone der retinalen Ganglienzellen sammeln sich an der Sehnervpapille und verlassen als Nervus opticus die Orbita. In der pigmentierten Maus kreuzen 95,5 % der Fasern des optischen Nerv (ON; optic nerve) im Chiasma opticum (optic chiasm) zur Gegenseite und ziehen als Tractus opticus (optic tract) zum kontralateralen Corpus geniculatum laterale (lateral geniculate body; LGN) des Thalamus sowie zum kontralateralen superioren Colliculus (superior colliculus; SC) des Mittelhirns. Das Corpus geniculatum laterale dient als Relay-Station. Die Fasern werden umgeschaltet und ziehen als Meyer-Schleife beziehungsweise Radiatio optica (optic radiations) zum visuellen occipitalen Cortex (primary visual cortex; Abbildung 5). Neben den Neuronen sind in der Retina noch eine Reihe von Gliazell-Populationen, wie Astrozyten und Müller-Glia lokalisiert, die für Stoffwechselfunktionen und als Stützgerüst unverzichtbar sind.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Läsionsmodells am Nervus opticus und der Struktur der Retina.**

**Links:** Querschnitt und Aufbau des Auges; Lokalisation der Nervus opticus Läsion durch Quetschung oder Axotomie zwei bis drei Millimeter distal der Papille unter Erhalt der retinalen Perfusion (Wohl et al. 2011). **Rechts:** Histologischer Aufbau der Retina im Querschnitt





**Abbildung 5: Das visuelle System; Überblick.**

Das visuelle System umfasst das Auge mit der Netzhaut (Retina), den Sehnerv (Nervus opticus), Teile des Thalamus (Corpus geniculatum laterale) und des Mittelhirns (Colliculus superior) sowie die Sehrinde (visueller Cortex).

### 3. Zielsetzung

Hintergrund der hier vorliegenden Dissertationsarbeit ist die Suche nach Möglichkeiten zur Neuroprotektion und Neuroregeneration nach schädigenden Prozessen im adulten zentralen Nervensystem. Eine gezielte Modulation von Apoptose und Axonregeneration in adulten Nervenzellen ist für degenerative, traumatische und hypoxische Gewebeschäden des zentralen Nervensystems von großem Interesse. Ein gentherapeutischer Ansatz unter Verwendung antiapoptotischer und progenerativer Gene könnte dabei eine vielversprechende, auch klinisch applikable Therapiestrategie darstellen.

Es wurde der Einfluss der transgenen, spezifisch neuronalen Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins Bcl-X<sub>L</sub> auf das protektive und regenerative Potential neuronaler Zellen untersucht. Zur Untersuchung der postläsionalen regenerativen Antwort von adulten retinalen Ganglienzellen wurde das Modell der Quetschläsion des Nervus opticus gewählt. Dabei ist von Vorteil, dass der optische Nerv seiner Struktur nach zwar einem peripheren Nerv sehr ähnlich ist, entwicklungsphysiologisch jedoch dem zentralen Nervensystem zugehörig ist. Die Läsion konnte gut kontrollierbar und reproduzierbar durchgeführt werden, ohne dabei „Kollateralschäden“ zu bewirken.

Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass das Genprodukt Bcl-X<sub>L</sub> nach adenoviraler Vektortransduktion zu einer Stimulation des intrinsischen Regenerationspotentials *in vitro* und zur Zellrettung *in vitro* und *in vivo* führt (Kretz et al. 2004a). Die Weiterführung dieses Forschungsansatzes sollte mit dieser Arbeit das antiapoptotische und regenerative Potential von Bcl-X<sub>L</sub> in adulten retinalen Ganglienzellen *in vivo* untersuchen. Hierfür standen zwei transgene Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierende Mauslinien zur Verfügung. Durch das transgene Tiermodell können Nebenwirkungen wie Vektorbedingte, insbesondere durch Inflammation verursachte Transduktionsschäden an den Zielzellen sowie in umliegenden Zellen und Geweben verhindert werden. Durch Vektorvermittelten Transfer wird selten eine 100 %ige Transduktionsrate erreicht, wohingegen im transgenen Tiermodell bei der Nutzung eines geeigneten Promotors Fragen zur Transduktionseffizienz keine Rolle spielen. Auch kann eine zeitlich unlimitierte Wirkung des Transgens als gesichert gelten, sofern stabile Insertionen vorliegen. Das murine *in vivo* Modell stellte eine wesentliche Erweiterung und Verbesserung der vorab angewandten experimentellen Modelle dar. Durch den Vergleich mit Wildtyp-Tieren sollte die positive Beteiligung von Bcl-X<sub>L</sub> an den läsionsinduzierten Reaktionen neuronaler Apoptose und axonaler Schädigung untersucht werden.

**Es wurden folgende Fragestellungen formuliert:**

- Zeigen die zwei transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien einen speziellen neuronalen Phänotyp in der Retina?
- Welche Auswirkungen hat die transgene Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in adulten Neuronen des zentralen Nervensystems auf das Regenerations- und Apoptoseverhalten von läsionierten retinalen Ganglienzellen *in vitro* und *in vivo*?
- Existieren Unterschiede im Regenerations- und Apoptoseverhalten der beiden transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien?
- Kann transgenes Bcl-X<sub>L</sub> durch die Läsion induziert werden?
- Welche zeitliche Dynamik bestimmt das Expressionsmuster von Bcl-X<sub>L</sub>?

## 4. Methodik

### 4.1. Tiere und Läsionsmodell

#### Tiere

Für die Versuche wurden ausschließlich adulte (>P60) Mäuse verwendet. Es standen zwei transgene Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierende Mausstämme, jeweils mit einem genetischen C57Bl/6 Hintergrund, zur Verfügung. Als Wildtyp-Kontrolltiere wurden daher C57Bl/6 Mäuse von der Firma Charles River verwendet.

Dementsprechend fand die Zucht der transgenen Bcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tiere auf einem C57Bl/6 Hintergrund statt. Die Zuchtpärchen für die Linie Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> wurden freundlicherweise von Herrn Alexander Sh. Parsadian (Centre for the Study of Nervous System Injury, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Tiere, die humanes Bcl-X<sub>L</sub> Protein neuronal unter Kontrolle des Tα1α-Tubulinpromotors überexprimieren (Parsadian et al. 1998). Als Besonderheit weist dieser Promoter eine Induzierbarkeit durch neuronale Schädigung auf (Gloster et al. 1994). Die neuronale Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in dieser Linie war für das embryonale, postnatale und adulte Stadium bereits vorab beschrieben worden (Parsadian et al. 1998).

Zum Anderen wurden Elterntiere der Mauslinie Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup>, die eine neuronale Überexpression von murinem Bcl-X<sub>L</sub> unter Kontrolle des Thy1-Promotors aufweisen (Wiessner et al. 1999), von Herrn Bernd W. Böttger (Universitätsklinikum Heidelberg, Klinik für Anästhesiologie, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Eine Charakterisierung dieser Tiere sowie die Verifikation einer neuronalen Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression in dieser Zuchtlinie waren vorab durch Wiessner und Kollegen vorgenommen worden.

Im Folgenden werden die entsprechenden Mauslinien anhand der in Tabelle 1 verwendeten Abkürzungen bezeichnet. Die Genotypisierung der Nachkommen durch Schwanzspitzenbiopsie und Polymerasekettenreaktion führte die Core Unit Transgene Tiere des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Jena durch. Die Zucht und Pflege der Tiere wurde vom Institut für Versuchstierkunde (IVTK) der Friedrich-Schiller-Universität Jena übernommen. In beiden Zuchtlinien entwickelten sich die Tiere gegenüber alterskorrelierten C57Bl/6 Kontrolltieren unauffällig, diese waren fertil und zeigten keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten.

Wt	Wildtyp C57Bl/6
Tα1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	Transgene Mauslinie, die unter Kontrolle des Tα1α-Tubulinpromotors neuronal humanes Bcl-X <sub>L</sub> überexprimiert (Parsadanian et al. 1998)
Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	Transgene Mauslinie, die unter Kontrolle des Thy1-Promotors neuronal murines Bcl-X <sub>L</sub> überexprimiert (Wiessner et al. 1999)

**Tabelle 1: Abkürzungen der verwendeten transgenen Mauslinien.**

## **Läsionsmodell**

### **Die Narkose**

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale Applikation einer sterilen 5 %igen Lösung aus Chloralhydrat in PBS (phosphate buffered saline) in einer körpergewichtsadaptierten Dosierung von 0,37 g/kg Körpergewicht. Die Narkosetiefe am sedierten Tier wurde durch die Auslösung des Kornealreflexes, durch eine kurze Schmerzreizapplikation an der Schwanzspitze sowie an der Vibrissenmotilität auf Berührung bemessen.

Durch eine letale intraperitoneale Überdosis von 30 %igem Chloralhydrat in PBS wurden die Tiere zum Versuchsende schmerzlos getötet.

Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorschriften und den Richtlinien der Friedrich-Schiller-Universität Jena zum Umgang mit Tieren in der Forschung durchgeführt. Alle Versuche waren durch das Regierungspräsidium Erfurt genehmigt (TVA „Regeneration geschädigter ZNS-Neurone bei Nagern *in vitro* und *in vivo*“, Reg.-Nr. 02-10/04, S.Isenmann/A.Kretz).

### **Die Quetschläsion des Nervus opticus**

Als Ansatz zur Untersuchung der Neuroprotektion und Regeneration retinaler Ganglienzellen wurde das Modell der mechanischen Quetschläsion („crush“) des Nervus opticus angewandt. Die Läsion führt zum retrograden Verlust von 80 bis 90 % der retinalen Ganglienzellen in den ersten zwei Wochen (Sautter und Sabel 1993). Histopathologisch entspricht die Quetschläsion einer Axonotmesis, das heißt es kommt zu einer Unterbrechung der Axonfaszikel, wobei die myelinhaltigen Hüllstrukturen erhalten bleiben und so als Leitschiene für neu auswachsende Axone dienen können.

Mit einer gebogenen Rundklemme wurde der Bulbus des narkotisierten Tieres leicht luxiert und mobilisiert. Anschließend wurde der Nervus opticus cirka zwei Millimeter hinter dem hinteren Augenpol mit derselben Klemme für zehn Sekunden gequetscht. Um die retinale Durchblutung zu kontrollieren und um permanente retinale Ischämien und okuläre Hämatome (retinal, Glaskörper) auszuschließen, wurde der Augenhintergrund mit Hilfe eines feuchten Objektträgers und einem Binokularmikroskop funduskopiert. Tiere, bei denen die Durchblutung nach Interventionsende nicht unmittelbar wieder einsetzte beziehungsweise eine dauerhafte Hornhauttrübung als Zeichen gestörter retinaler Perfusion und Diffusion auffiel, wurden für die Versuche nicht weiter eingesetzt. Die Explantation der Retinae erfolgte am 14. Tag nach der Läsion. Die mechanische Quetschung des Nervus opticus erfolgte an den Versuchstieren uni- oder bilateral.

Für die Regenerationsuntersuchungen am Nervus opticus sowie zur Überprüfung der Vollständigkeit der axonalen Quetschläsion wurden 24 Stunden vor beziehungsweise 13 Tage nach der Sehnervenquetschung 2  $\mu$ l Alexa Fluoro 488 Konjugat der Choleratoxin-Untereinheit B (CT-B) intravitreal in jedes Auge injiziert. Das an ein Fluorochrom gekoppelte Choleratoxin diente dabei als anterograde Tracer für die Axone der retinalen Ganglienzellen. Für die Tracerapplikation wurde der Bulbus cirka einen Millimeter distal des temporalen Limbus mit einer 34 gauche Nadel mit Konnektion an eine 5  $\mu$ l Hamilton-Spritze punktiert und das Toxin langsam injiziert. Um ein Austreten von Tracersubstanz sowie von Kammerwasser zu verhindern, wurde die Nadel erst mit einer Latenz von ein bis zwei Minuten extrahiert. Da einige Linsenproteine, wie zum Beispiel Oncomodulin proregenerative Eigenschaften besitzen (Fischer et al. 2001, Leon et al. 2000), wurde streng darauf geachtet, die Linse nicht zu verletzen. Zum Schutz vor einer Hornhaut austrocknung und zur Infektionsprophylaxe wurden einmalig nach der Intervention Ofloxacin-haltige Augentropfen und Bepanthen-haltige Augensalbe appliziert. Die retinale Explantation erfolgte am zweiten oder am 14. postläsionalen Tag.

### **Die Axotomie des Nervus opticus und die retrograde Fluorogoldmarkierung**

Die Axotomie des Nervus opticus wurde jeweils linksseitig mit Hilfe eines binokularen Operationsmikroskopes durchgeführt. Zunächst wurde eine laterale Kanthotomie (Lidschnitt des Ligamentum palpebrale laterale) unter Schonung der dort verlaufenden Gefäße gesetzt. Anschließend wurden die Bindehaut und der Musculus rectus lateralis durchtrennt und damit ein Zugang zur Orbita geschaffen. Durch stumpfes Präparieren mit besonderer Rücksicht auf den latero- und retrobulbär gelegenen Venenplexus wurde der Sehnerv freigelegt. Etwa einen

Millimeter distal des Bulbus erfolgte die longitudinale Inzision der Dura mater, der Nervenscheide des Sehnervs, mit einer feinen Mikroschere. Die nervale und retinale Blutversorgung durch Äste der Arteria ophthalmica beachtend und erhaltend, wurde anschließend der Nervus opticus quer durchtrennt. Zur Kontrolle der retinalen Blutversorgung erfolgte nach dem Eingriff eine Spiegelung des Augenhintergrundes mit Hilfe eines angefeuchteten Deckgläschens unter dem Operationsmikroskop. Tiere, bei denen die Durchblutung nach Operationsende nicht in allen vier Quadranten der Retina nachweisbar war, wurden für die Versuche nicht weiter verwendet.

Im Anschluss wurden der Lidschnitt und das Augenlid mit je einer Naht verschlossen und eine einmalige topische Behandlung mit Ofloxacin-haltigen Augentropfen und Bepanthen-haltiger Augensalbe vorgenommen, um Verschmutzung, Infektion und Austrocknung vorzubeugen. Zur retrograden Markierung der retinalen Ganglienzellen wurde ein Schwämmchen in den Zwischenraum zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf platziert, das mit dem lipophilen Tracer Fluorogold (3 % Fluorogoldlösung in 10 % DMSO) getränkt worden war. Man bedient sich dabei der biologischen Eigenschaft lebender Zellen lipophile Fluoreszenzmoleküle aufzunehmen und retrograd zum Zellsoma zu transportieren, in welchem sie angereichert werden können, solange die Zelle vital und stoffwechselaktiv ist. Das Schwämmchen wurde zwischen den Axonstümpfen *in situ* belassen. Die retinale Explantation erfolgte am 14. Tag nach Axotomie und für die Kontrollbedingung 24 Stunden nach Axotomie, so dass ausreichend Zeit für die retrograde Propagierung des Tracers bestand. Die apoptotische Degeneration retinaler Ganglienzellen beginnt erst ab dem dritten postläsionalen Tag, so dass 24 Stunden nach der Axotomie noch 100 % der retinalen Ganglienzellen am Leben sind.

## 4.2. Phänotypisierung der nativen Retina

Die konventionelle histologische Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung diente der strukturellen Phänotypisierung der nativen Retina in den zwei transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien. Als Kontrolle wurden unläsionierte Retinae der Wildtyp-Tiere verwendet. Dadurch sollten durch die Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression bedingte Veränderungen der retinalen Zytoarchitektur identifiziert werden.

Nach der Eukleation der Bulbi wurde durch einen radiären Schnitt entlang der Ora serrata der Augenbulbus eröffnet und Kornea, Linse und Corpus vitreum entfernt. Die Retina verblieb im Augenbecher. Nach Vorfixierung in 4 % Paraformaldehyd (PFA) über

20 Minuten erfolgte die Kryoprotektion der präparierten Augenbecher mit anliegender Retina mittels Gewebeinkubation in 30 % Saccharose über Nacht bei 4°C. Das Gewebe wurde anschließend in dem Einbettmedium Tissue Tek in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden zehn Mikrometer dicke koronare Schnitte der Retina angefertigt. Jeweils zehn Schnitte wurden auf einen Superfrost-Plus Objektträger aufgenommen, für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Zur histologischen HE Färbung wurden die koronaren, zehn Mikrometer dicken Schnitte der Retina nach 45minütiger Trocknung bei 37°C mit 4 % PFA über 20 Minuten nachfixiert und anschließend dreimalig für zehn Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate fünf Minuten in Hämatoxylinlösung gefärbt, zehn Minuten mit destilliertem Wasser differenziert und anschließend in einer wässrigen 0,5 %igen Eosinlösung gegengefärbt. Anschließend erfolgte die zehnminütige Spülung in destilliertem Wasser und die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 % Ethanol). Abschließend wurden die Objektträger in Mowiol eingedeckelt.

### **4.3. Axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vitro***

#### **4.3.1. Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes**

Die Regenerationsuntersuchungen an retinalen Ganglienzellen *in vitro* wurden anhand einer primären retinalen Explantatkultur nach dem Protokoll von Kretz et al. (Kretz et al. 2004b, Kretz et al. 2007) durchgeführt. Die retinale Primärkultur wurde zum Tag 14 nach Sehnervenquetschung in einem speziellen, von definierten Wachstumsfaktoren freien S-MEM Medium unter Zugabe von 10 % FCS (fetal calf serum) sowie unter Anreicherung mit essentiellen Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und anderen Substanzen angelegt. Das FCS wurde stets frisch zum S-MEM hinzugegeben. Der pH des Mediums wurde vor jeder Präparation mit einem Indikatorpapier kontrolliert und gegebenenfalls auf den Sollwert justiert.

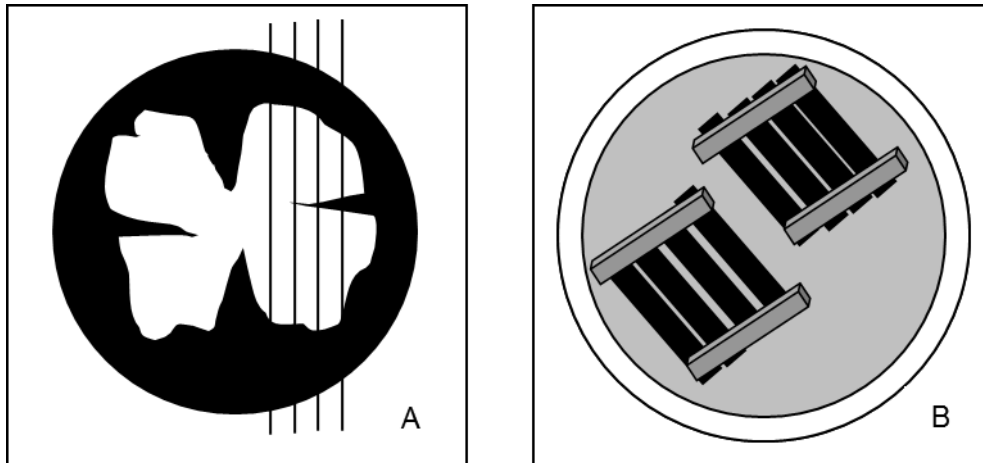
Für die Explantatkultur wurde zunächst der noch geschlossene Bulbus mit Hilfe steriler, chirurgischer Mikroinstrumente aus der Orbita enukleiert, in steriles PBS übertragen, für fünf Sekunden zur Keimabtötung in 70 %igen Ethanol geschwenkt und in steriles Präparationsmedium (FCS-freies S-MEM Medium) gegeben.

Die weitere Präparation der Retina erfolgte unter semisterilen Bedingungen mit Sicht durch ein Binokularmikroskop unter einer Sterilbank. Alle Instrumente wurden während der



Präparation wiederholt in 70 %iges Ethanol getaucht und abgeflammt. Instrumente unter der Sterilbank wurden vor Beginn der Präparation mit UV-Licht für 30 Minuten sterilisiert.

Zunächst wurden durch einen zirkulären Schnitt entlang der Ora serrata die vorderen Augenabschnitte (Kornea und Linse) entfernt und der Glaskörper *in toto* extrahiert. Anschließend wurde die Retina schalenartig von der Innenseite des Augenbeckers abgelöst, am Discus mit einer Schere abgetrennt und von der Choroidea und dem Pigmentepithel befreit. Ein kleeblattförmiges Einschneiden zu vier gleich großen Quadranten (Abbildung 6A) ermöglichte das plane Ausbreiten der Retina auf einem in sterilem PBS permeabilisierten Nitrozellulosefilter, auf welchem diese dreimalig kurz angesaugt und dann mit Hilfe eines sterilen weißen Rundfilters auf dem Nitrozellulosefilter adhäriert wurde. Anschließend wurde der die Retina tragende Filter mit einem „Tissue Chopper“ in 400 Mikrometer breite Streifen unterteilt. Je zweimal vier Streifen wurden in vorbehandelte hydrophile Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen aufgelegt (Abbildung 6B) und zwar derart, dass die retinalen Ganglienzellen auf dem Membranboden der Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschale zum Liegen kamen. Die verwendeten Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen besitzen als Boden eine atmungsaktive Membran, die den Gasaustausch zwischen der Umgebung und dem Gewebe ermöglicht.



**Abbildung 6: Retinale Explantatkultur.**

**A)** Die kleeblattförmig eingeschnittene Retina wird auf dem Nitrozellulosefilter ausgebreitet und in Streifen geschnitten. **B)** Gewebestreifen werden mit der Nervenfaserschicht nach unten auf die adhäsive Oberfläche aufgebracht und durch Klötzchen in der retinafreien Randzone beschwert.

Die Vorbehandlung der Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen erfolgte über zwei Tage durch sterile, homogene Beschichtung mit je 250 µl Poly-L-Lysin (1 mg/ml in PBS) und für einen Tag mit je 250 µl Laminin (20 µg/ml in PBS). Nach den beiden Beschichtungsvorgängen mit anschließender Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde überschüssiges Poly-L-Lysin beziehungsweise Laminin durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Zum Schutz

vor Austrocknung wurde 1 ml FCS-freies S-MEM Medium abschließend in die Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen pipettiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Kultivierung im Inkubator bei 37°C. Pro Kulturschale wurden acht bis zwölf Streifen aufgelegt und jeweils vier mit zuvor autoklavierten Metallklötzchen ausschließlich an den kurzen Querrändern der Filterstreifen fixiert. Abschließend wurden 3 ml auf 37°C angewärmtes S-MEM Medium mit 10 % FCS, 4 µl Vitamin C (1 µg/ml) und 4 µl Fungizone (1:1000) zugegeben. Die Explantatkulturen wurden sieben Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator ohne weiteren Mediumwechsel möglichst erschütterungsfrei und unter kontrollierter Humidität kultiviert.

#### **4.3.2. Immunhistochemie der retinalen Primärkultur**

Für die immunhistochemische Darstellung der Regeneration *in vitro* wurde nach sieben Tagen in Kultur phosphoryliertes Neurofilament regenerierter Neuriten durch den monoklonalen SMI-31 Antikörper nachgewiesen. Die indirekte Immunhistochemie wurde an den retinatragenden Filterstreifen in den Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen durchgeführt.

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die retinatragenden Filterstreifen für 20 Minuten in 4 ml 4 % PFA in den Petri Perm<sup>®</sup> Kulturschalen fixiert und anschließend vorsichtig dreimalig in TBS (tris buffered saline) gewaschen. Anschließend wurden die Filterstreifen in einer Lösung von 10 % NGS (normal goat serum) in 1 % BSA in TBS und 1 % Triton-X100 für eine Stunde inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper SMI-31 gegen phosphoryliertes Neurofilament in einer Verdünnung von 1:500 in 2 % NGS in 1 % BSA in TBS und 1 % Triton-X100 für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach Abpipettieren des primären Antikörpers und dreimaligem Waschen der Streifen in PBS wurde als geeigneter Sekundärantikörper Alexa Fluor 488-gekoppeltes *goat-anti-mouse* IgG in einer Verdünnung von 1:500 in 10 % NGS in 1 % BSA in PBS und 1 % Triton-X100 aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Abpipettieren des Sekundärantikörpers und dreimaligem Waschen in PBS wurden die Metallklötzchen abgenommen, die Petri Perm<sup>®</sup> Membran um die Streifen herum rechteckig mit einem Skalpell eingeschnitten, und diese, mit den retinalen Filterstreifen nach unten gedreht, auf mit Mowiol bestrichene Objektträger aufgelegt.

## 4.4. Neuroprotektion und axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vivo*

### 4.4.1. *In situ*-Hybridisierung: Molekularbiologischer Nachweis von Bcl-X<sub>L</sub> Transkripten

Bei allen Arbeiten zur Vorbereitung und Durchführung der *in situ*-Hybridisierung wurden puderfreie Handschuhe getragen, um Kontaminationen mit RNAasen zu vermeiden. Alle verwendeten Glaswaren wurden vor dem Gebrauch bei 180°C acht Stunden gebacken. Alle Lösungen wurden mit RNAase-freien Chemikalien und autoklaviertem bidestilliertem Wasser hergestellt, anschließend nochmals autoklaviert und steril filtriert.

#### Aufarbeitung des Gewebes

Für den Nachweis von Bcl-X<sub>L</sub> mRNA wurden transgene Tiere unläsioniert und 14 Tage nach unilateraler Sehnervenquetschung verwendet. Als Kontrolle dienten unter gleichen Läsionsbedingungen Wildtyp-Tiere. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Überdosis von 30 %igen Chloralhydrat getötet und rasch unter semisterilen und RNAase-freien Bedingungen dekapitiert, beidseitig der Bulbus enukleiert und das Gehirn entnommen. Die Bulbi wurden in steriles PBS überführt und mit Hilfe eines Binokularmikroskopes von Kornea, Linse und Corpus vitreum befreit. Der präparierte Augenbecher mit anliegender Retina wurde in dem Einbettmedium Tissue Tek in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden zehn Mikrometer dicke koronare retinale Schnitte angefertigt. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Superfrost-Plus Objektträger aufgenommen, für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zur Hybridisierung bei -80°C aufbewahrt.

#### Herstellung der RNA Sonden

Zunächst mussten für die *in situ*-Hybridisierung geeignete *antisense*- und zur Kontrollhybridisierung die entsprechenden *sense*-Sonden hergestellt werden. Als Ursprung für die RNA-Sonden der Gene von endogenem und transgenem Bcl-X<sub>L</sub> wurden klonierte Sequenzen aus Plasmidklonen eingesetzt. Es standen zwei Plasmide (KS/SV 40 p A1 und hBcl-X<sub>L</sub>) zur Verfügung. Eine für die transgene Bcl-X<sub>L</sub> kodierende DNA wird durch den KS/SV 40 p A1 Klon detektiert; transgene und endogene DNA für die Bcl-X<sub>L</sub> Expression werden durch die RNA-Sonde aus dem hBcl-X<sub>L</sub> Plasmid erkannt. Die Plasmide enthalten einen Replikationsursprung, an welchem die Replikation starten kann, als auch ein für die

Ampicillinresistenz kodierendes Gen. Das Bakterium ist somit in der Lage, in einer mit Ampicillin behandelten Kultur zu überleben.

In der Molekularbiologie ist die Koppelung zwischen diesen beiden Abschnitten auf dem Plasmid notwendige Voraussetzung, um spezifisch transfizierte Bakterienkulturen heranzuzüchten und somit ausreichende Mengen der benötigten DNA zu erhalten. Das Bakterium, in welches das entsprechende DNA Stück inseriert wurde, wird in eine mit Ampicillin versetzte Kultur gebracht und ist dort, im Gegensatz zu anderen Bakterien, überlebensfähig. Diese Vorgehensweise dient dazu, Kontaminationen mit ubiquitär vorkommenden Bakterien, welche keine geklonte DNA enthalten, zu verhindern.

Die Klone zur Sondenherstellung wurden von Herrn Alexander Sh. Parsadian (Centre for the Study of Nervous System Injury, Washington University School of Medicine, St.Louis, Missouri) zur Verfügung gestellt. Zur Richtungsbestimmung des Inserts sowie zur Kontrolle der Übereinstimmung mit der publizierten Gensequenz (Parsadian et al. 1998) erfolgte die Sequenzierung der Plasmide durch die Firma JenaGen GmbH, Jena. Die notwendigen Primer (Parsadian et al. 1998) wurden von der Firma MWG-Biotech AG Oligo Production synthetisiert.

### **Transformation, Isolation und Analyse von Plasmid-DNA**

Zur Transformation wurden kompetente *Escherichia coli* DH5-alpha Zellen verwendet, welche die Fähigkeit haben zirkuläre DNA aufzunehmen. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl TE Puffer gelöst. Zu 3 µl der DNA-Lösung wurden 50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Erwärmung der Suspension für 45 Sekunden auf 42°C wurde 950 µl LB Medium hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl der Zellsuspension auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vier bis sechs Klone der auf der Ampicillin-Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden mit einem sterilen Spatel gepickt und in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (40 µg/ml) für acht Stunden bei 37°C im Schüttler vermehrt. Anschließend wurden 500 µl der 5 ml Zellsuspension in 500 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (40 µg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 37°C im Schüttler weiter vermehrt. Aus der Kultur der gepickten Klone wurde die Plasmid-DNA in einer Maxipräparation gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen unter Einsatz des Maxi-Prep-Kits isoliert. Das Verfahren beruht auf der alkalischen Zellwandlyse bei gleichzeitiger Denaturierung der genomischen und der Plasmid-DNA. Durch die nachfolgende Absenkung

des pH-Wertes werden genomische DNA und bakterielle Proteine ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt und renaturiert wird. Nach Abtrennung der gefällten Komponenten wurde die Plasmid-DNA direkt mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 5 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, nachfolgend zehn Minuten bei 13600 rpm zentrifugiert, an der Luft getrocknet, die präzipitierte DNA in TE Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der isolierten DNA in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Dabei entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA (Sambrook et al. 1989).

Den nächsten Schritt stellte der Restriktionsverdau, die Linearisierung des amplifizierten plasmiden DNA-Stückes dar. Dazu nutzt man Endonucleasen, welche an einer bestimmten Stelle der DNA schneiden. In dieser Arbeit wurden EcoR1 und XBa1 für die transgene Sonde KS/SV 40 p A1 und XBa1 und HIND3 für die endogene hBcl-X<sub>L</sub> Sonde benutzt, welche direkt an der am 5'- und 3'- Ende inserierten, geklonten DNA ansetzen und spezifisch schneiden. Je nach Enzym wurden 0,5 bis 1 U/ $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Der Verdau wurde in dem vom Hersteller angegebenen Puffer angesetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen Bromphenolblau-Lösung gestoppt.

Restriktionsansatz:

<u>KS/SV 40 p A1 sense</u>		<u>KS/SV 40 p A1 antisense</u>	
2,5 $\mu\text{l}$	DNA	2,5 $\mu\text{l}$	DNA
5 $\mu\text{l}$	Puffer 2	5 $\mu\text{l}$	EcoR1 Puffer
5 $\mu\text{l}$	10 x BSA	5 $\mu\text{l}$	10 x BSA
1 $\mu\text{l}$	XBa1	1 $\mu\text{l}$	EcoR1
36,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	36,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
<u>hBcl-X<sub>L</sub> sense</u>		<u>hBcl-X<sub>L</sub> antisense</u>	
4 $\mu\text{l}$	DNA	4 $\mu\text{l}$	DNA
5 $\mu\text{l}$	Puffer 2	5 $\mu\text{l}$	Puffer 2
5 $\mu\text{l}$	10 x BSA	5 $\mu\text{l}$	10 x BSA
1 $\mu\text{l}$	HIND3	1 $\mu\text{l}$	XBa1
35 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	35 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O

Die entstandenen Fragmente konnten durch Auftrennung in einer 1 %igen Agarose-Gel-Elektrophorese in TAE-Puffer aufgetrennt werden. Außerdem enthielten die Agarose-Gele zur Visualisierung der DNA Ethidiumbromid (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert. Die DNA-Proben wurden mit

Probenpuffer 1 versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 Volt mit TAE-Puffer als Elektrophoresepuffer. Nach Abschluss der Elektrophorese konnte die aufgetrennte DNA über die Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe unter UV-Beleuchtung nachgewiesen werden. Anhand eines Längenstandards war eine Abschätzung der Größe der Fragmente möglich.

### ***In vitro* Transkription**

Das Reaktionsprodukt des Restriktionsverdaus wurde mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Das Verfahren beruht auf einer chromatographischen Reinigung von DNA über eine Silicagelmatrix. Dazu wird die DNA in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidiniumhydrochlorid an eine Silicagelsäule gebunden, während nicht eingebaute Desoxynukleotide sowie die denaturierten Proteine nicht an die Säulenmatrix binden und sich im Durchfluss befinden. Die Säule wird mit einem 70 %igen ethanolhaltigen Puffer gespült, um das in Ethanol lösliche Guanidiniumhydrochlorid zu entfernen. Die DNA bleibt dabei durch den hohen Ethanolgehalt unlöslich auf der Säule. Nach Trocknen der Säule wird die gereinigte DNA mit einem leicht alkalischen Puffer von der Säule eluiert.

Die gereinigte DNA diente als Matrize für die Synthese der mit Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonden. Mit Hilfe des DIG-RNA-Labeling Kit (Sp6/T7) der Firma Roche wurden nach Angaben des Herstellers DIG-markierte *antisense* und *sense* mRNA-Sonden durch *in vitro* Transkription der klonierten DNA mit T7/T3 RNA-Polymerase hergestellt.

Im Einzelnen wurde folgender Ansatz gewählt, der bei 37°C für zwei Stunden inkubiert wurde:

- 1 µg DNA in einem Endvolumen von 13 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 2 µl 10 x NTP labeling mixture
- 2 µl 10 x Transcription buffer
- 1 µl RNAase Inhibitor
- 2 µl T7/T3 Polymerase

Ausgehend von einem Mikrogramm Template-DNA beträgt die Ausbeute circa zehn Mikrogramm DIG-markierte mRNA voller Länge. Diese wurde anschließend gemäß den Angaben des Herstellers mit Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Nachfolgend wurden die Sonden mittels alkalischer Hydrolyse (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 90 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) in etwa 200 bp große Fragmente zerkleinert, um die Penetration der Sonde ins Gewebe zu erleichtern. Nach einer Inkubationsdauer von 20 Minuten bei 60°C wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Lithiumdichlorid neutralisiert und mit drei Volumen absolutem, eiskaltem Ethanol gefällt. Nach zweimaligem Waschen des RNA-Pellets mit 70 %igem Ethanol und Trocknen in einer Vakuumzentrifuge wurde die RNA in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Qualität des Gesamttranskriptes und der hydrolysierten RNA-Sonde wurde mit einem denaturierenden Agarose-Gel überprüft. Dabei wurden 1,5 g Agarose in 86 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 10 ml 10 x MOPS Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf circa 60°C wurden unter leichtem Schwenken 3 ml Formaldehyd (30 %) zugegeben, anschließend das Gel in die Gelkammer gegossen und nach vollständigem Auspolymerisieren mit dem späteren Laufpuffer (1 x MOPS-Puffer) überschichtet. Die RNA-Proben und der verwendete RNA-Längenstandard wurden mit zwei Volumen frisch angesetzttem Probenpuffer 2 versetzt, gründlich durchmischt und nach siebenminütiger Inkubation bei 65°C auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 bis 80 Volt für zwei bis drei Stunden. Die Konzentration von RNA wurde in wässrigen Lösungen photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Dabei entspricht OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA (Sambrook et al., 1989).

Die Effizienz des Digoxigenin-Einbaus wurde mittels Dot-Blot untersucht. Hierzu wurde das Protokoll der Firma Roche genau befolgt. Dabei wurde zur Kontrolle eine DIG-markierte DNA mit bekannter absteigender Konzentration (1000, 100, 1, 0,1 pg) auf einen Nylonfilter geblottet. Die erhaltenen DIG-markierten RNA-Sonden wurden in entsprechender absteigender Verdünnung aufgebracht. Im Vergleich der Sonden-Spots mit den Spots der Test-DNA mit bekannter DIG-Konzentration zeigte sich, dass der DIG-Einbau in allen vier Sonden erfolgreich war (100 pg DIG/µl).

### ***In situ*-Hybridisierung**

Die *in situ*-Hybridisierung umfasste drei Teilschritte: die Permeabilisierung der Gewebeschnitte, die eigentliche Hybridisierung und die Posthybridisierung mit anschließender Farbreaktion.

#### **Permeabilisierung der Gewebeschnitte**

Zunächst wurden die Kryoschnitte in 4 % PFA fixiert. Es folgten zwei Waschschrte in PBS und Wasser. Um den Eintritt der DIG-markierten RNA-Sonden in das Gewebe zu erleichtern,

wurden die Gewebeschnitte einer 15minütigen chemischen Denaturierung in 0,2 M Salzsäure unterzogen. Die Schnitte wurden dreimal in PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten in 0,1 M Triethanolamin (TEA; pH 8,0) mit 0,25 % Essigsäure-Anhydrit äquilibriert und acetyliert, um eine unspezifische Anheftung der RNA-Sonden zu verhindern. Es folgte ein Waschschrift in PBS, bis die Schnitte über eine Ethanolreihe (70 %, 80 %, dann 96 %) dehydriert wurden.

### **Hybridisierung**

Zur Hybridisierung wurden jeweils 100 µl Hybridisierungspuffer mit 400 ng/µl RNA-Sonde auf die Objektträger aufgebracht. Die Komponenten wurden gut durchmischt, zur Denaturierung der Nukleinsäuren zehn Minuten auf 60°C erhitzt und sofort für zehn Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Objektträger mit einem silikonisierten Deckgläschen abgedeckt, mit Parafilm gegen Verdunstung geschützt und bei 58°C für 16 Stunden inkubiert. Die geeignete Sondenmenge zur Erzeugung eines auswertbaren Signals war vorher in einer Konzentrationsreihe bestimmt worden.

### **Posthybridisierung und Farbreaktion**

Nach 16stündiger Inkubation wurden die Deckgläschen vorsichtig abgenommen und die ungebundene Sonde sowie Reste der Hybridisierungslösung durch intensives Waschen entfernt. Dazu diente eine Konzentrationsreihe von Trinatriumcitratpuffern, die jeweils 0,1 % Natriumdodecylsulfat enthielten.

#### Folgende Waschschrirte wurden durchgeföhrt:

1. 10 Minuten in 1 x SSC
2. 2 x 15 Minuten in 0,2 x SSC
3. 2 x 45 Minuten in 0,1 x SSC bei 54°C
4. 5 Minuten in 2 x SSC

Für den immunhistochemischen Nachweis der DIG-markierten Sonden wurden die Objektträger zuerst in TBS für zehn Minuten gewaschen und danach für eine Stunde in Blockungslösung (TBS mit 0,5 % Blocking-Reagenz) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger für 1,5 Stunden in Blockungslösung, die mit einer Verdünnung von 1:500 Alkalische Phosphatase konjugierte Antikörper gegen DIG enthielten, inkubiert.

Daran schloss sich ein dreimaliges Waschen in TBS, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation in Detektionspuffer, an. Die Farbreaktion erfolgte mit NBT/BCIP, einem Substrat für die Alkalische Phosphatase, in Detektionspuffer bei 30°C über Nacht. Am nächsten



Morgen wurden die Objektträger unter fließendem destilliertem Wasser für 30 Minuten abgespült, getrocknet, in Entellan eingedeckelt und lichtmikroskopisch untersucht.

#### **4.4.2. Biochemischer Nachweis**

##### **Gewebepräparation für Kryoschnitte**

Für die Untersuchung neuroprotektiver und regenerativer Effekte von Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo* wurden transgene Tiere unläsioniert und 14 Tage nach unilateraler Sehnervenquetschung verwendet. Als Kontrollen dienten unter gleichen Läsionsbedingungen Wildtyp-Tiere. Für die Herstellung von Kryoschnitten zur Durchführung immunhistochemischer Analysen wurden der Augenbulbus und drei bis fünf Millimeter des proximalen Nervus opticus präpariert und die Retina und das Nervenfragment isoliert. Dabei wurde durch einen radiären Schnitt entlang der Ora serrata der Augenbulbus eröffnet und Kornea, Linse und Corpus vitreum entfernt und die Retina im Augenbecher weiter bearbeitet. Nach Vorfixierung in 4 % PFA über 20 Minuten erfolgte die Kryoprotektion der präparierten Augenbecher mit anliegender Retina und Nervus opticus mittels Gewebeeinkubation in 30 %iger Saccharose in PBS über Nacht bei 4°C. Das Gewebe wurde anschließend in dem Einbettmedium Tissue Tek in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden zehn Mikrometer dicke koronare Schnitte der Retina sowie zehn Mikrometer dicke transversale und longitudinale Schnitte des jeweiligen Nervus opticus angefertigt. Jeweils zehn Schnitte wurden auf einen Superfrost-Plus Objektträger aufgenommen, für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zur immunhistochemischen Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Weiterhin wurden whole mounts (wm; kleeblattförmige plane Ausbreitung der Retina) zur retinalen Zellzahlbestimmung von den axotomierten und retrograd Fluorogold-markierten sowie von den intravitreal mit Cholera-toxin 488 injizierten Tieren angefertigt. Hierzu wurde die Retina, wie bereits beschrieben, aus dem Augenbecher isoliert, komplett von der Choroidea und dem Pigmentepithel befreit, 20 Minuten in 4 % PFA fixiert und einem dreimaligen Waschen in PBS unterzogen. Es folgte das kleeblattförmige Einschneiden der Retina, das native plane Eindeckeln in Glycerol in PBS (1:1 Lösung) und die zeitnahe fluoreszenzmikroskopische Digitalisierung und Auswertung.

##### **Immunhistochemie der Gewebeschnitte**

Das native und postläsionale Expressionsmuster von Bcl-X<sub>L</sub> in der Retina sowie die postläsionale Axonregeneration *in vivo* im Nervus opticus wurde durch immunhistochemische

Färbungen in den entsprechenden Präparaten charakterisiert. Hierfür dienten als primäre Antikörper ein Bcl-X<sub>L</sub> Antikörper, der Neurofilament detektierende Antikörper SMI-31 und ein das Wachstumsprotein GAP-43 detektierender Antikörper.

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die koronaren Schnitte der Retina nach 45minütiger Trocknung bei 37°C mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimalig für zehn Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für zwei Stunden in 10 % NGS in 1 % BSA in PBS mit 1 % Triton-X100 inkubiert. Der Primärantikörper anti-Bcl-X<sub>L</sub> wurde in 2 % NGS in 1 % BSA in PBS mit 1 % Triton-X100 1:500 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle übrigen Wasch- und Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsschüttler statt. Am folgenden Vormittag wurden die Präparate mit PBS gespült und gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der speziesspezifische farbstoffkonjugierte Sekundärantikörper Cy3 in 10 % NGS in 1 % BSA in PBS mit 1 % Triton-X100 eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurde anschließend mit DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid) gegengefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Kerngegenfärbung mit einem Absorptionsmaximum bei 359 nm und einer Emission bei 461 nm. Es entsteht ein blauer Farbeindruck. Vor dem abschließenden Eindeckeln in Mowiol wurden die Schnitte dreimalig in PBS gewaschen. Bis zur zeitnahen fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Präparate dunkel und trocken gelagert.

Die Präparate des Nervus opticus wurden doppelt mit einem primären Antikörpermisch aus anti-SMI-31 und anti-GAP-43 und sekundär mit einem Gemisch aus Alexa Fluor 488-gekoppeltem *goat-anti-mouse* IgG in einer Verdünnung von 1:500 und AMCA-gekoppeltem *goat-anti-rabbit* IgG in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Die DAPI-Färbung entfiel.

#### **4.5. Nachweis des Bcl-X<sub>L</sub> Proteins durch Immunoblotverfahren**

Im Immunoblotverfahren, auch Western-Blot genannt, wurde die postläsionale Induktion von Bcl-X<sub>L</sub> als Protein in einer Zeitreihe untersucht. Dazu wurden Retinae unläsioniert sowie drei, fünf, sieben, zehn und 14 Tage nach Sehnervenquetschung isoliert. Um die Proteolysevorgänge in den Geweben möglichst gering zu halten, wurde die Präparation in eiskühlem PBS möglichst rasch durchgeführt. Der Strukturhalt des Gewebes stand für die Proteingewinnung nicht im Vordergrund.

### **Lysatgewinnung**

Die isolierte Retina wurde zügig in Eppendorf-Cups überführt und in je 100 µl Lysepuffer durch mehrfaches Aufziehen mit einer Kanüle des Kalibers 14 und 18 gauche in einer 5 ml Spritze mechanisch homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und wiederholt mit dem Vortex-Gerät gemischt. Im Anschluss wurde das Lysat zehn Minuten bei 4°C bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in 5 µl Aliquots bei -20°C tiefgefroren.

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Um die Proteinkonzentration des jeweiligen Retinahomogenats zu bestimmen, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Umstand ausgenutzt, dass es durch die Bindung von Proteinen an das Bradford-Reagenz (Coomassie-Brillantblau) zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm kommt (Bradford 1976). 2 µl Proteinprobe und 498 µl Aqua bidestillata wurden gemischt. Auf die Proteinlösung wurden 0,5 ml Bradford Reagenz pipettiert, gut gemischt und zehn Minuten dunkel inkubiert. Diese Lösung wurde in eine Photometerküvette überführt, und bei einer Wellenlänge von 595 nm die Extinktion bestimmt. Der Referenzwert (Nullwert) wurde mit 5 µl Lysepuffer anstatt der Proteinprobe bestimmt. Anschließend wurde anhand der Eichkurve die Proteinkonzentration ermittelt.

### **Western Blot**

Mittels der Western Blot Analyse können spezifische Proteine in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden. Die Proteinproben werden durch vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (geblottet). Die Proteine können durch die spezifische Bindung primärer Antikörper, an welche sich wiederum enzymgekoppelte Sekundärantikörper (HRP-konjugiert; horseradish peroxidase) binden, durch anschließende Chemilumineszenzreaktion detektiert werden. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden pro Ansatz 3 µg Protein mit 10 µl 6xSDS-Ladepuffer versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl angeglichen und für fünf Minuten bei 100°C denaturiert. Der Proteingrößenstandard wurde unverdünnt in der ersten Tasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 10 %igen Trenngelen bei 100 Volt Spannung für ein bis zwei Stunden in einer Elektrophoresekammer in PAGE-Puffer. Der Gellauf war beendet, nachdem das

Bromphenolblau den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Mit Hilfe der Semidrytechnik konnten in einer Blottingkammer die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Hierzu wurden die Blotting-Pads, die Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran und das Trenngel in Transferpuffer getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde zusätzlich für fünf Sekunden in Methanol geschwenkt, fünf Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Transferpuffer bis zum luftblasenfreien Fertigen der Blotting-Apparatur gelegt:

Folgende Schichten wurden nacheinander in die Blotting-Apparatur gelegt:

- Blotting-Pad
- 1 Filterpapier (Whatman-Papier)
- Trenngel
- Nitrozellulosemembran
- 1 Filterpapier (Whatman-Papier)
- Blotting-Pad

Es wurde dann für eine Stunde bei 100 Volt und 4°C geblottet.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde mit einer Blockierungslösung unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, um so unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wurde die Membran mit dem unkonjugierten Primärantikörper anti-Bcl-X<sub>L/S</sub> in 5 % BSA in TBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen nach drei je fünfminütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (HRP-konjugiertes *anti-rabbit* IgG, 1:2000 in TBS-T) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Entfernen von überschüssigem Antikörper erfolgte durch erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils fünf Minuten. Zur Detektion der HRP-markierten Proteine wurde ein Chemilumineszenzverfahren (ECL plus<sup>®</sup> Reagenz) gemäß den Angaben des Herstellers angewandt. Die Exposition erfolgte in der Dunkelkammer auf einem Film (Hyperfilm ECL).

## **4.6. Aufarbeitung und histologische Analyse**

### **Digitalisierung**

Die fertiggestellten, immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden licht- und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt (bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung) und digitalisiert abfotografiert (Mikroskop Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland; Digitalkamera

AxioCam Hrc, Zeiss, Deutschland, mit computergestützter Kamera-Software AxioVisionLE-Release 4.1; Computer Fujitsu computers Siemens).

### **Auswertung des Neuritenwachstums *in vitro***

Die fixierten und mit anti-SMI-31 gefärbten retinalen Explantate mit ihren ausgewachsenen Neuriten wurden bezüglich deren Anzahl und Länge ausgewertet. Von jeder Retina wurden je drei bis fünf Streifen an drei bis fünf Stellen des maximalen Auswachsens der Neuriten ausgemessen. Abgerissene Neuriten ohne Kontakt zur Basis wurden nicht ausgewertet. Gemessene Verzweigungen eines Neuriten wurden zu dessen Gesamtlänge addiert. Die gemessenen Einzelwerte aus den Berechnungen für Länge und Anzahl der Neuriten wurden jeweils addiert und ihr Mittelwert auf eine retinale Basisstrecke (100 µm) normiert.

### **Auswertung der Bcl-X<sub>L</sub> Transkription und Expression, der Neuroprotektion und Regeneration *in vivo* in der Retina und im Nervus opticus**

#### Bcl-X<sub>L</sub> Transkription und Expression:

Lichtmikroskopisch wurden anhand der mittels *in situ*-Hybridisierung bearbeiteten retinalen Schnittpräparate die postläsionalen Veränderungen der Bcl-X<sub>L</sub> spezifischen mRNA Transkription in der Retina bezüglich der Induktion, Lokalisation und Anzahl der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA positiven Zellen deskriptiv beurteilt.

Darüber hinaus wurde die Anzahl der immunhistochemisch mit dem Bcl-X<sub>L</sub> Antikörper markierten retinalen Ganglienzellen und damit die Anzahl der das Bcl-X<sub>L</sub> Protein exprimierenden retinalen Ganglienzellen deskriptiv am äquatorialen retinalen Schnitt beurteilt. Die Bcl-X<sub>L</sub> exprimierenden Zellen wurden anhand ihrer Lokalisation als retinale Ganglienzellen identifiziert und ihre Anzahl, Distribution und Morphologie mit dem Expressionsmuster in Wildtyp-Kontrollen verglichen.

#### Bcl-X<sub>L</sub> bedingte Neuroregeneration *in vivo*:

Die Beurteilung regenerativer Effekte *in vivo* erfolgte anhand von longitudinalen und transversalen Schnitten durch den läsionierten Nervus opticus mit immunhistochemischen Methoden. Dabei wurden selektive Analysen in präläsionalen, intraläsionalen sowie postläsionalen Abschnitten des Nervus opticus durchgeführt. Eine valide, quantitative Einzelfaserbestimmung war in den longitudinalen Schnitten aufgrund der Überlagerung von partiell geschlängelten und nicht mehr in Faszikeln gebündelten, neu generierten Axonen nicht möglich. Alternativ wurde in der longitudinalen Schnittebene die maximale Fläche mit postläsional generierten GAP-43 positiven Neuriten relativ zum Diameter des Nervus opticus

quantitativ erfasst. Zur weiteren Beurteilung wurde in der transversalen Schnittebene die Dichte der orthograd angeschnittenen GAP-43 und SMI-31 positiven Axone, die dabei jeweils als Punkt zur Darstellung kamen, deskriptiv erfasst. Besonderer Wert wurde dabei auf die Lokalisation der neu entstandenen Axone vor, innerhalb oder jenseits der Narbenregion gelegt.

#### Bcl-X<sub>L</sub> bedingte Neuroprotektion *in vivo*:

Zur Bestimmung der mittleren Dichte an überlebenden retinalen Ganglienzellen wurde nach einem etablierten Protokoll verfahren. In definierten Sektoren (drei radiale Bereiche: 1/6 innere Retina; 3/6 mittlere Retina und 5/6 äußere Retina; 6/6 entspricht dem gesamten retinalen Radius in der C57Bl/6 Maus) wurde fluoreszenzmikroskopisch an mindestens drei Stellen die Zellzahl retrograd markierter, Fluorogold-positiver retinaler Ganglienzellen im whole mount bestimmt (Schmeer et al. 2002, Isenmann et al. 1997). Aus den Einzelwerten der verschiedenen Messbereiche eines Abschnittes wurde ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Die erhaltene Anzahl wurde auf eine gemeinsame Grundfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) normiert und die Rate geretteter retinaler Ganglienzellen (RRR: RGC rescue rate) bestimmt. Zur Berechnung der RRR diente die Formel:

$$\text{RRR} = (\text{N}_{\text{ther}} - \text{N}_{\text{con}}) / (\text{N}_{\text{tot}} - \text{N}_{\text{con}}) \times 100.$$
 Dabei ist  $\text{N}_{\text{tot}}$  die Anzahl retinaler Ganglienzellen in der unläsionierten Retina des transgenen Tieres,  $\text{N}_{\text{con}}$  die Anzahl retinaler Ganglienzellen des Wildtyp-Tieres 14 Tage nach der Sehnervenquetschung und  $\text{N}_{\text{ther}}$  die Anzahl retinaler Ganglienzellen der transgenen Tiere 14 Tage nach der Sehnervenquetschung (Klocker et al. 1997).

#### **Auswertung der Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression im Immunoblot**

Die native und postläsionale Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression im Immunoblot wurde quantitativ anhand digitalisiert aufgenommener Filme (Hyperfilm ECL) mit dem Programm AIDA erfasst. Mit dieser Software lassen sich feine Unterschiede zwischen den spezifischen Signalintensitäten (in Graustufen), der Intensität des „Hintergrundrauschens“ auf der Membran und der Qualität des Chemilumineszenzverfahrens mit der Einheit „Light Arbitrary Units“ (LAU) normiert und standardisiert erfassen. Der Messbereich muss zuvor vom Anwender festgelegt werden. Die Messung erfolgte eindimensional, wobei Auswertungsrechtecke um jede Proteinspur (Lane) gelegt werden, welche vom Programm als sogenannte „Profile“ erkannt werden. Das Programm erfasst dabei über der horizontalen Breite eines jeden Profils die durchschnittliche Helligkeit. Diese Helligkeiten werden mit der Einheit LAU (Light Arbitrary Units = willkürliche Lichteinheiten) quantitativ erfasst, gegen

die Höhe des Profils in Millimeter aufgetragen und graphisch dargestellt. So entsteht ein Graph, welcher auf Höhe der gefärbten Proteinbande einen steilen Gipfel zeigt, da hier auf Grund der fluoreszierenden ECL-Färbung die Helligkeit am höchsten ist. Die Lichtmenge, welche auf den übrigen Höhen des Profils gemessen wird, gilt als Hintergrundrauschen der Membran. Durch diesen Membranhintergrund legt das Programm eine Trendlinie, die sogenannte Grundlinie (Baseline). Der Gipfel der Kurve, der die fluoreszierende Proteinbande abbildet, kann manuell markiert werden. Das Programm berechnet innerhalb dieser Markierung die Fläche unter der Kurve, wobei die Baseline als Nulllinie dient. Am Ende der eindimensionalen Auswertung ordnet AIDA jedem vermessenen Profil die integrierte Fläche unter den Gipfeln und den Membranhintergrund in LAU zu. Die LAU-Werte aus AIDA wurden als Tabelle in Excel exportiert und mit diesem Programm weiter bearbeitet. Zunächst wurden jedem Messort die Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression und die dazugehörige  $\beta$ -Actinexpression als Ladekontrolle zugeordnet. Zur Vergleichbarkeit der Werte untereinander und zur Erfassung einer Regulation in der Proteinexpression musste der LAU-Wert des Bcl-X<sub>L</sub> Messortes durch den Messwert von  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle dividiert werden. Der Quotient wurde „Optische Intensität“ genannt und in Diagrammen graphisch dargestellt.

### **Statistik**

Alle Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten beziehungsweise wurden pro Versuchsreihe für jede Grundbedingung mindestens drei Tiere untersucht (Tabelle 2). Zur Prüfung, ob zwischen den Mittelwerten signifikante Unterschiede vorlagen, wurden bei normal verteilten Daten unabhängiger Stichproben der t-Test beziehungsweise bei nicht normal verteilten Daten unabhängiger Stichproben der U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. In den Experimenten, die mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurden einfaktorielle und multifaktorielle ANOVA-Tests verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 10.0 for Windows, SPSS inc., Chicago, IL, USA). Für alle Ergebnisse wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als minimales Signifikanzniveau angenommen.

2.1	Versuch			
	<u>Kondition</u>	<u>Methode</u>	<u>Einzelversuch je Tierkonstrukt</u>	<u>Tierzahl je Tier- konstrukt</u>
1. <b>Ta1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Wildtyp</b>	Charakterisierung des transgenen Phänotyps			
	Nativ	Histologie; Hämatoxylin/Eosin Färbung	1	5
	Neuroregeneration- Einfluss transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression auf die axonale Regeneration läsionierter retinaler Ganglienzellen 1. <i>in vitro</i>			
	14 d p crush	Explantation und Kultivierung der Retina	5	15
	2. <i>in vivo</i>			
	14 d p crush	Immunhistochemischer Nachweis regenerierender Axone durch SMI-31 und GAP-43 Markierung		
		1. im Longitudinalschnitt des Nervus opticus	2	5
		2. im Transversalschnitt des Nervus opticus	2	5
	Neuroprotektion – Einfluss transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression auf das Überleben axotomierter retinaler Ganglienzellen			
	Axotomie und retrograde Fluorogold-markierung	Nachweis fluorogoldmarkierter retinaler Ganglienzellen im whole mount		
		1. 24 Stunden nach Axotomie	4	5
		2. 14 Tage nach Axotomie	3	5
	Morphologie transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression in der Retina			
	Nativ und 14 d p crush	Immunhistochemischer Nachweis der prä- und postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina	3	10
		Nachweis der prä- und postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> mRNA Transkription in der Retina	3	10
	Regulation der postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> Expression			
	Nativ sowie 3, 5, 7 und 14 d p crush	Nachweis der Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina mittels Immunoblot		
		Nativ	5	5
		3 d p crush	5	5
		5 d p crush	5	5
		7 d p crush	5	5
		14 d p crush	5	5

**Tabelle 2.1: Methodisch-konzeptionelle Einteilung der Versuchsgruppe der Ta1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tiere und Wildtyp-Tiere mit den jeweiligen Tierzahlen.**



2.2	Versuch			
	<u>Kondition</u>	<u>Methode</u>	<u>Einzelversuch</u>	<u>Tierzahl</u>
2. Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	Charakterisierung des transgenen Phänotyps			
	Nativ	Histologie; Hämatoxylin/Eosin Färbung	1	5
	Neuroregeneration- Einfluss transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression auf die axonale Regeneration läsionierter retinaler Ganglienzellen 1. <i>in vitro</i>			
	14 d p crush	Explantation und Kultivierung der Retina	5	15
	2. <i>in vivo</i>			
	14 d p crush	Immunhistochemischer Nachweis regenerierender Axone durch SMI-31 und GAP-43 Markierung im Longitudinalschnitt des Nervus opticus	3	5
	Neuroprotektion – Einfluss transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression auf das Überleben axotomierter retinaler Ganglienzellen			
	Axotomie und retrograde Fluorogold-markierung	Nachweis fluorogoldmarkierter retinaler Ganglienzellen im whole mount		
		1. 24 Stunden nach Axotomie	4	5
		2. 14 Tage nach Axotomie	3	5
	Morphologie transgener Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression in der Retina			
	Nativ und 14 d p crush	Immunhistochemischer Nachweis der prä- und postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina	4	10
	Regulation der postläsionalen Bcl-X <sub>L</sub> Expression			
	Nativ sowie 3, 5, 7 und 14 d p crush	Nachweis der Bcl-X <sub>L</sub> Expression in der Retina mittels Immunoblot		
		Nativ	5	5
		3 d p crush	5	5
		5 d p crush	5	5
		7 d p crush	5	5
		14 d p crush	5	5

**Tabelle 2: Methodisch-konzeptionelle Einteilung der Versuchsgruppe der Ta1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tiere (2.1), der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tiere (2.2) und der Wildtyp-Tiere (2.1) mit den jeweiligen Tierzahlen.**

## 5. Ergebnisse

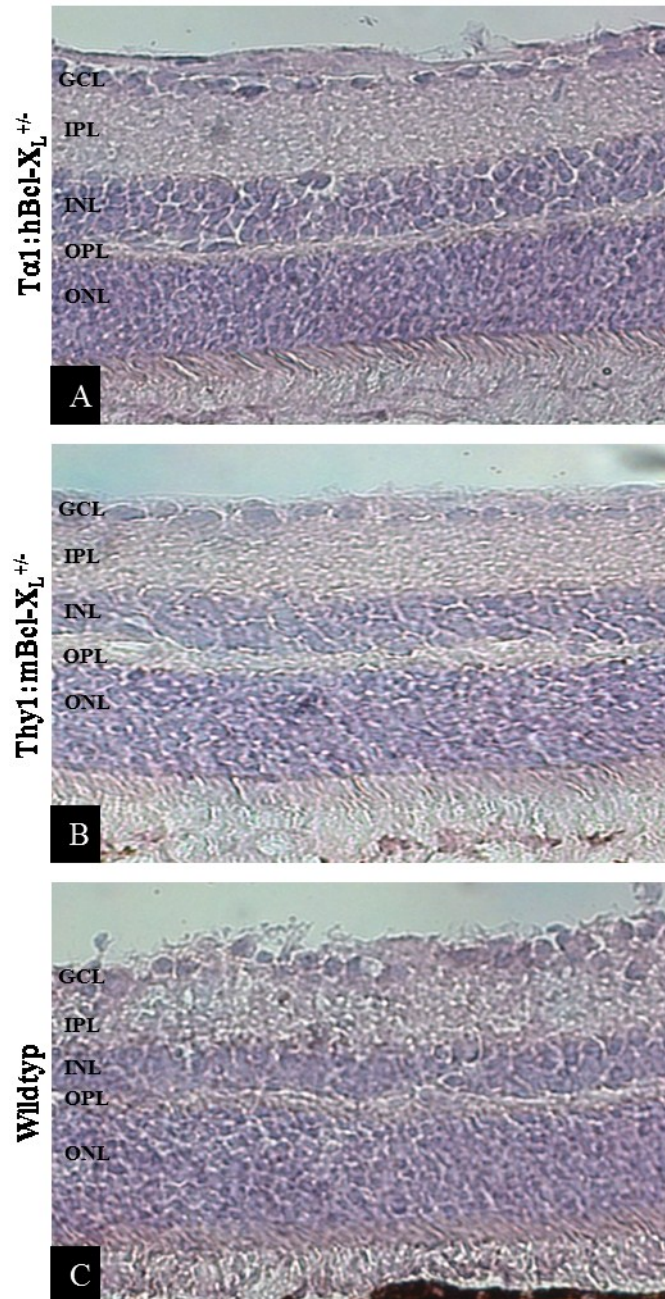
Nach einer Quetschläsion des Nervus opticus kommt es im Rahmen der von distal nach proximal voranschreitenden axonalen Wallerschen Degeneration zu einer retrograden Apoptose der Ganglienzellen in der Retina. Die übrigen neuronalen Populationen (Photorezeptoren, Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen) sowie die in den Faserschichten vorhandenen Astrozyten reagieren soweit bekannt auf die Verletzung nicht mit Apoptose (Scherer und Schnitzer 1991).

Ausgangshypothese dieser Arbeit war die durch frühere Studien begründete Annahme, dass Bcl-X<sub>L</sub> die axonale Regeneration und Antiapoptose von retinalen Ganglienzellen nach einer Verletzung positiv beeinflussen kann. Diese Vermutungen sollten in zwei *in vivo* Mausmodellen verifiziert werden. Wichtigstes Ziel war die vergleichende Analyse der antiapoptotischen und regenerativen Effekte in adulten transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Tieren und Wildtyp-Tieren nach Quetschung des Nervus opticus als Teil des zentralen Nervensystems.

### 5.1. Charakterisierung des transgenen Phänotyps in der nativen Retina

In äquatorialen Schnitten der nativen Retina wurde an den beiden transgenen Bcl-X<sub>L</sub> Mauslinien im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren untersucht, ob die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> zu einem neuronalen Phänotyp in der Retina führt. Dazu wurde eine konventionelle histologische Hämatoxylin/Eosin Färbung der nativen Retina durchgeführt.

Die Strukturanalyse zeigte keine durch die neuronale Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression verursachte Veränderung der physiologischen Zytoarchitektur der nativen Retina. Unbeeinträchtigt imponierte die Ausbildung folgender charakteristischer Zellschichten: die äußere nukleäre Körnerschicht (ONL), die die Zellkerne der Stäbchen und Zapfen enthält, deren Sinnesrezeptoren dem Pigmentepithel anliegen, die äußere plexiforme Schicht (OPL), in der die Synapsen zwischen den Photorezeptorzellen und den Bipolarzellen sowie Horizontalzellen liegen, dann die innere nukleäre Körnerschicht (INL) mit den Bipolarzellen, die innere plexiforme Schicht (IPL) mit den Amakrinzellen und den Synapsen von Bipolar- und Ganglienzellen und schließlich die Ganglienzellschicht (GCL), die von der inneren Gliagrenzmembran (Endfüßchen der Müllerzellen und eine Basalmembran) begrenzt wird. Darüber bilden die Axonfortsätze der retinalen Ganglienzellen die Nervenfaserschicht, die sich zum Nervus opticus bündeln (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Phänotypisierung der nativen Retina der transgenen Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> (A) und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> (B) Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (C).**

Der quantitative Vergleich der einzelnen retinalen Schichtdiameter zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien untereinander beziehungsweise im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abbildung 8). Die Nervenfaserschicht wurde aus diesen Messungen ausgeschlossen, da sie durch Abscherprozesse während des Schnittvorganges am Kryostaten artefaktanfällig ist. Auf mögliche zellmorphologische oder synaptische Veränderungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen.

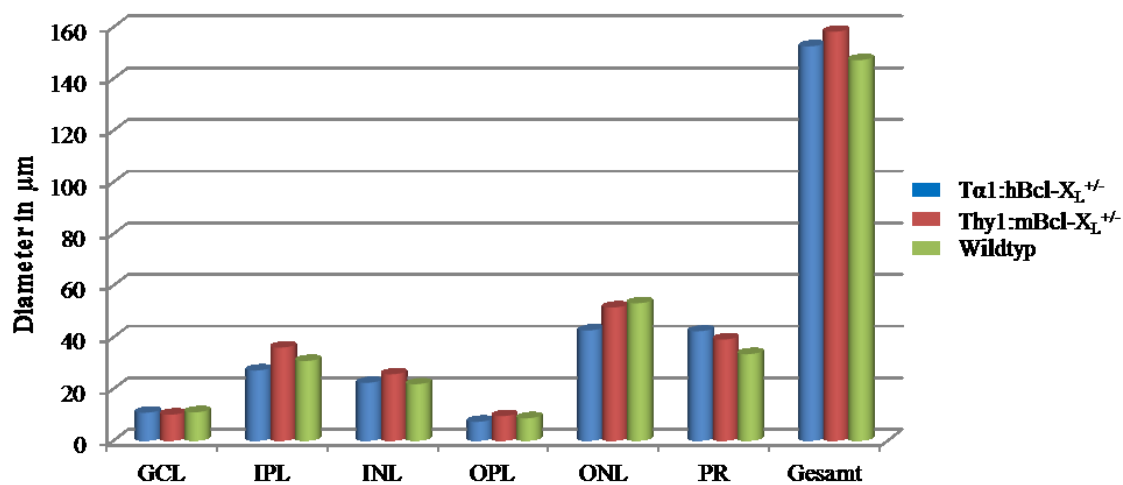


Abbildung 8: Zytoarchitektur der nativen Retina.

## 5.2. Neuroregeneration - Stimulation axonalen Wachstums durch transgene Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression

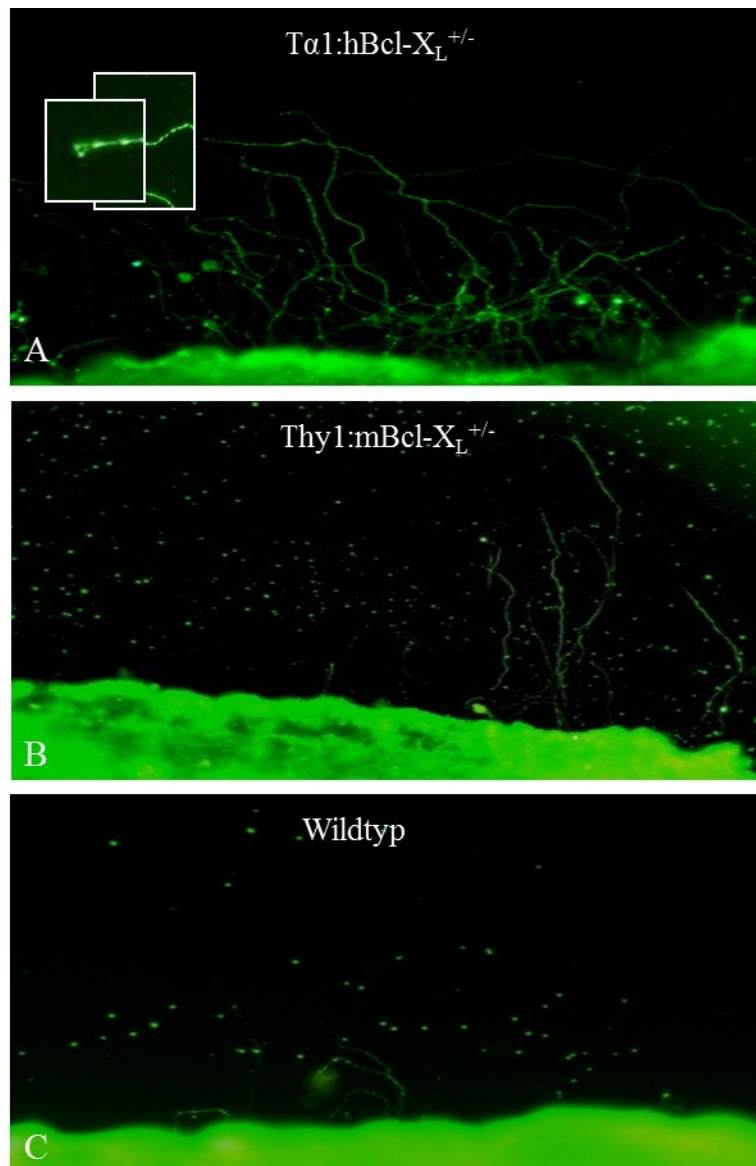
### 5.2.1. Transgene Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression fördert Neuroregeneration *in vitro*

In Explantatkulturen der Retina von transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mäusen wurde der Einfluss von Bcl-X<sub>L</sub> auf das Neuaussprossen von Neuriten untersucht. Die Retina der beiden transgenen Mauslinien Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> wurde 14 Tage nach der Sehnervenquetschung ohne zusätzliche Applikation von Wachstumsfaktoren kultiviert und nach sieben Tagen das Wachstum von Neuriten immunhistochemisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten Explantatkulturen von Wildtyp-Tieren. Mit dem verwendeten SMI-31 Antikörper wurden spezifisch lediglich axonale, jedoch keine dendritischen Aussprossungen detektiert.

In den Explantatkulturen beider Mauslinien bewirkte die transgene neuronale Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen eine deutliche Stimulation des Neuritenwachstums nach Sehnervenquetschung. Es wurde eine Steigerung der Regeneration in Bezug auf die

Neuritenlänge und die Neuritenanzahl im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Die Gewebestreifen wiesen ein gleichmäßiges Regenerationsmuster in zentralen und peripheren Bereichen der Retina auf. Morphologisch erschienen die neu generierten Neuriten vital; an den Enden der aussprossenden Neuriten konnte man teilweise bei hoher Vergrößerung die für neuronale Regeneration typischen Wachstumskegel identifizieren, die vor allem in embryonalem Gewebe ausgebildet werden (Tessier-Lavigne und Goodman 1996) und hier im adulten Modell mit rudimentären lammellipodien- und filopodienartigen Strukturen zur Darstellung kamen (Abbildung 9A). Die stärkste Wachstumsinduktion zeigte die  $Ta1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mauslinie (Abbildung 9A), in der das Gesamtlängenwachstum der Neuriten von  $124,56 \mu\text{m} / 100 \mu\text{m}$  Basis in den Kontrollen auf  $1087,96 \mu\text{m} / 100 \mu\text{m}$  Basis anstieg (Abbildung 10A). Die durchschnittliche Neuritendichte stieg von  $0,6$  Neuriten /  $100 \mu\text{m}$  Basis auf  $3,2$  Neuriten /  $100 \mu\text{m}$  Basis (Abbildung 10C). Das entspricht einer fast 18fachen Stimulation der Neuritenlänge beziehungsweise siebenfachen Stimulation der Neuritenanzahl durch transgene  $hBcl-X_L$  Überexpression unter dem  $Ta1\alpha$ -Tubulinpromotor im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 10B und 10D). Einzelne Neuriten erzielten ein Längenmaximum von  $2800 \mu\text{m}$ . Auf einer Strecke von  $100 \mu\text{m}$  konnten bis zu neun Neuriten gezählt werden. Die statistische Analyse ergab hohe Signifikanzen mit Werten von  $p < 0,001$  für die Länge, die Anzahl und deren Stimulation gegenüber den Kontrollen sowie für die Länge und deren Stimulation gegenüber der  $mBcl-X_L$  Überexpression unter dem  $Thy1$ -Promotor (Tabelle 3).

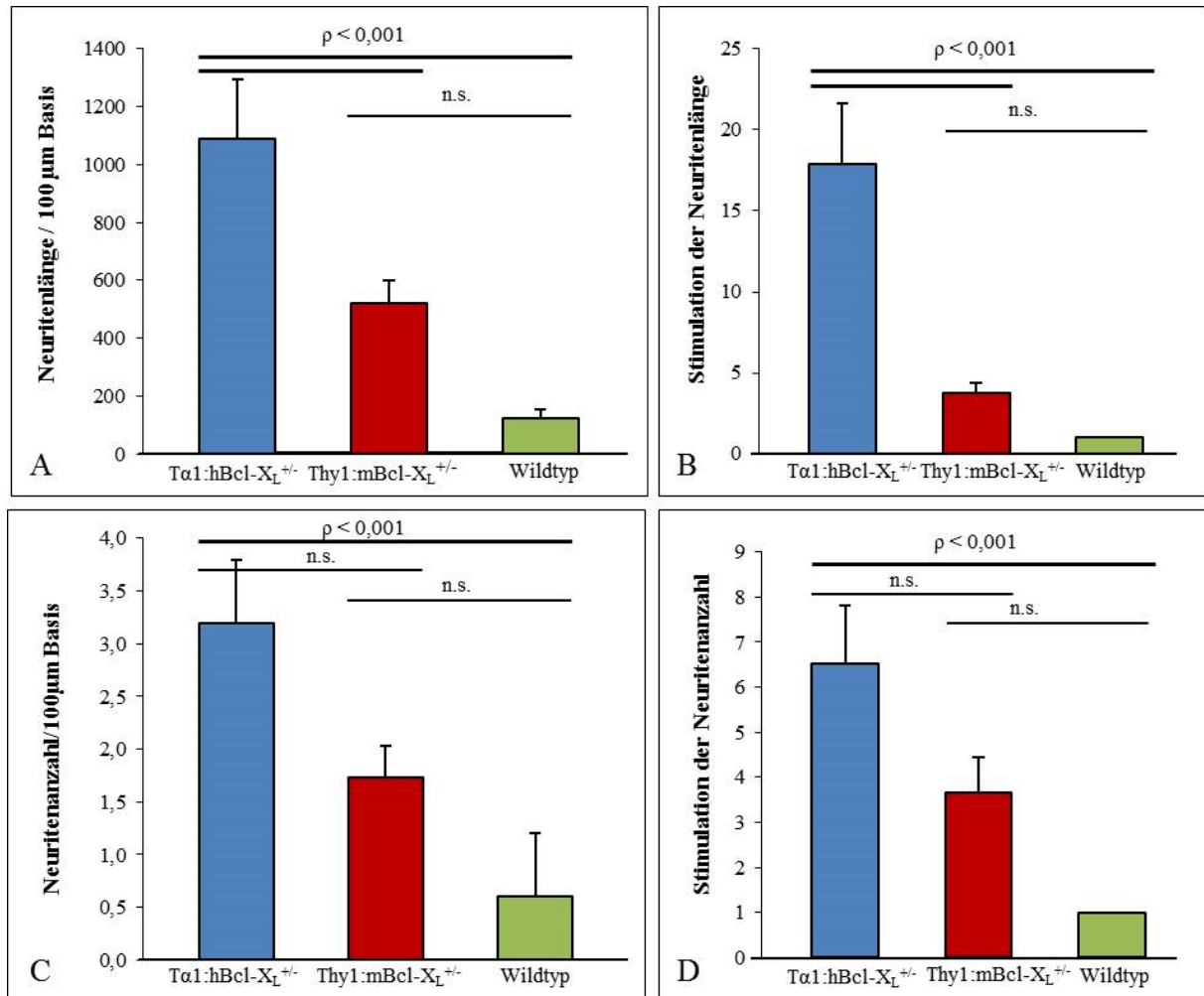
In den retinalen Kulturen der  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  Mauslinie fand sich ebenfalls eine Stimulation des Neuritenwachstums, die jedoch in der statistischen Analyse keine signifikanten Ergebnisse gegenüber den Kontrolltieren erbrachte (Abbildung 9B und 10 sowie Tabelle 3). Dabei wurde ein durchschnittlicher Anstieg der Gesamtlänge der Neuriten von  $124,56 \mu\text{m} / 100 \mu\text{m}$  Basis in den Kontrollen auf  $522,67 \mu\text{m} / 100 \mu\text{m}$  Basis in den Transgenen beobachtet (Abbildung 10A). Die Neuritenanzahl stieg von  $0,6$  auf  $1,73$  Neuriten /  $100 \mu\text{m}$  Basis (Abbildung 10C). Insgesamt konnte eine dreifache Stimulation der Neuritenanzahl und -länge im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abbildung 10B und 10D) verzeichnet werden. Unter transgener  $mBcl-X_L$  Überexpression erreichten einzelne Neuriten in den Explantatkulturen eine Länge von bis zu  $1040 \mu\text{m}$  mit einer Dichte von bis zu vier Neuriten pro  $100 \mu\text{m}$  Basis. Allerdings erzielten die Regenerationsergebnisse in der  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  Mauslinie auch in der Einzelanalyse ( $n = 5$ ) keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 9: Stimulation der Neuritogenese *in vitro* unter Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression.**

A-C: Detektion der Stimulation des axonalen Wachstums *in vitro* von läsierten retinalen Ganglienzellen unter transgener Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression mittels SMI-31 Immunhistochemie.

A (Kasten): rudimentäre Wachstumskegel neu formierter Neuriten retinaler Ganglienzellen in Kultur. Der Wachstumskegel besteht aus einem kegelförmig aufgetriebenen zytoplasmatischen Kern und zwei Arten von Fortsätzen: fußartige Ausläufer (Lammellipodien) und fühlartige Ausläufer (Filopodien), mit deren Hilfe sich die Nervenzelle ihren Weg durch das Gewebe bahnt.



	A Neuritenlänge/ 100 µm Basis (± SD)	B Stimulation der Neuritenlänge (± SD)	C Neuritenanzahl/ 100 µm Basis (± SD)	D Stimulation der Neuritenanzahl (± SD)
Tα1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	1087,96 ± 205,66	17,92 ± 3,79	3,20 ± 0,66	6,53 ± 1,33
Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	522,67 ± 78,71	3,65 ± 0,87	1,73 ± 0,31	3,80 ± 0,56
Wildtyp	124,56 ± 30,74	1	0,60 ± 0,11	1

**Abbildung 10: Quantifizierung der postläsionalen Neuritogenese *in vitro* unter Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression.**

Durchschnittliche Länge (A) und Anzahl (C) der *in vitro* regenerierten Neuriten pro 100 µm retinaler Basis; Stimulation des Längenwachstums der Neuriten (B) und der Neuritenanzahl (D) 14 Tage nach Sehnervenquetschung und nach sieben Tagen in Kultur.

	A Neuritenlänge/ 100 $\mu$ m Basis	B Stimulation der Neuritenlänge	C Neuritenanzahl/ 100 $\mu$ m Basis	D Stimulation der Neuritenanzahl
Ta1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> versus Wildtyp	$\rho < 0,001$	$\rho < 0,001$	$\rho < 0,001$	$\rho < 0,001$
Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> versus Wildtyp	$\rho = 0,15$	$\rho = 0,831$	$\rho = 0,26$	$\rho = 0,158$
Ta1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup> versus Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	$\rho < 0,001$	$\rho < 0,001$	$\rho = 0,084$	$\rho = 0,103$

**Tabelle 3: Statistische Analyse der Quantifizierung der postläsionalen Neuritogenese *in vitro* unter Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression.**

### 5.2.2. Transgene Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression fördert Neuroregeneration *in vivo*

Die bisher beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass die transgene Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression in retinalen Ganglienzellen zu einer hoch signifikanten Stimulation axonaler Regeneration *in vitro* gegenüber Wildtyp-Tieren führen kann ( $\rho < 0,001$ ). Um diese Beobachtung *in vivo* zu bestätigen, wurden 14 Tage nach Sehnervenquetschung Longitudinal- und Transversalschnitte des Nervus opticus aus den beiden transgenen Mauslinien und aus den Wildtyp-Tieren angefertigt und bezüglich regenerierender Axone quantitativ und morphologisch untersucht.

Der Identifikation axonaler Regeneration diene der immunhistochemische Nachweis des Neurofilamentmarkers SMI-31. Zur Differenzierung zwischen einem regenerierenden Axon und einem die Läsion überlebenden Axon in den Faszikeln wurde eine simultane Färbung mit dem Wachstumsmarker GAP-43 durchgeführt. GAP-43 ist als neuronenspezifisches Membranprotein ein charakteristischer und etablierter Marker für wachstumsassoziierte Prozesse (Benowitz et al. 1990, Benowitz und Routtenberg 1997). Die Expression von GAP-43 wird in retinalen Ganglienzellen durch eine Verletzung des Sehnerven erhöht und insbesondere in den auswachsenden Spitzen, den Wachstumskegeln regenerierender Axone reinduziert.

In Abbildung 11, im Longitudinalschnitt des Nervus opticus, ist exemplarisch das immunhistochemische Verhalten von Axonen des Nervus opticus transgener Ta1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse sowie von Wildtyp-Tieren gegenüber GAP-43 und SMI-31 Antikörpern 14 Tage nach Sehnervenquetschung dargestellt. Es wird deutlich, dass die Reexpression des wachstumsassoziierten Proteins GAP-43 sehr gut mit dem Neurofilamentmarker SMI-31 kolokalisiert ist. In nicht wachstumsaktiven Präparaten konnten



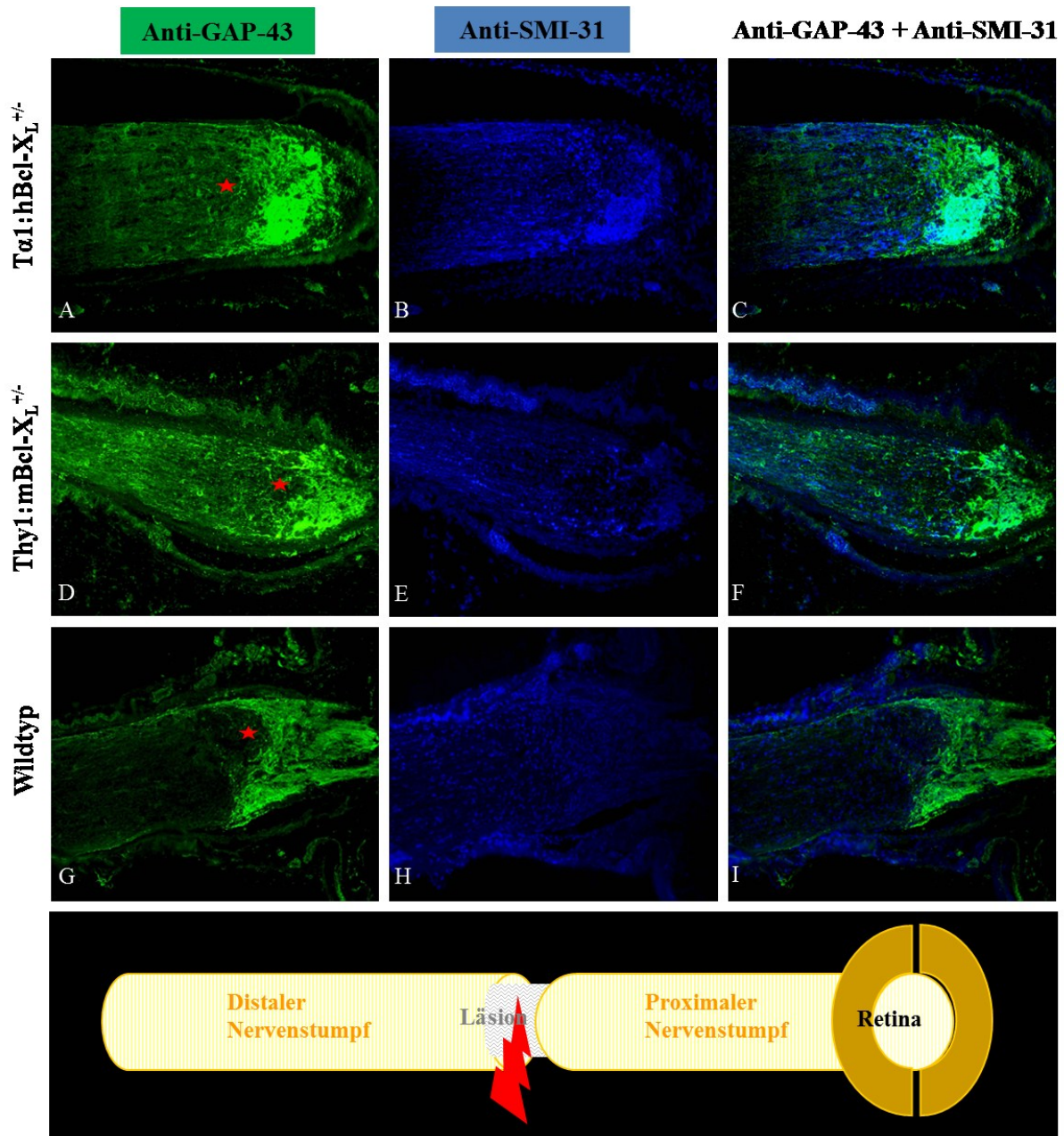
keine residuellen SMI-31 positiven Axone nachgewiesen werden, was die Vollständigkeit der Läsion im Läsionsmodell der Sehnervenquetschung widerspiegelt. Die morphologische Beurteilung GAP-43 positiver Axone in seriellen longitudinalen Schnitten zeigte in den transgenen Mauslinien  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  (Abbildung 11A-11C) und  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  (Abbildung 11D-11F) eine deutliche Induktion des GAP-43 Proteins, die mit der stimulierten postläsionalen Regeneration gegenüber den Wildtyp-Tieren (Abbildung 11G-11I) korrelierte. Die mit einer starken Immunreaktivität für GAP-43 einhergehenden Axoneogenese wird bei dieser Schnittführung im proximalen Abschnitt des Nervenstumpfes sichtbar, beginnt neuroanatomisch aber wahrscheinlich am Soma der retinalen Ganglienzellen. Eine Einzelfaseranalyse ließ sich in den Longitudinalschnitten nicht suffizient durchführen, da das Axonwachstum in mehreren Ebenen innerhalb der dreidimensionalen Nervenmatrix erfolgte und aufgrund der geringen Tiefenschärfe unter dem Mikroskop zumeist nur eine Axonebene zu einem Zeitpunkt beurteilt werden konnte.

In allen untersuchten Sehnerven ( $n = 5$ ) der  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäuse konnten GAP-43 positive Axone detektiert werden, die über das Narbenareal der Läsionsstelle hinweg in den distalen Teil des gequetschten Sehnerven einwuchsen. Auffällig war die deutlich stärkere Regenerationsantwort proximal der Läsionsstelle im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Die Mehrheit der regenerierenden Axone stoppte allerdings an der Grenze zu der fibrösen Narbe. In den  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen konnten jedoch in allen untersuchten Sehnerven ( $n = 5$ ) regenerierende Axone detektiert werden, die im Randbereich über die fibröse Narbe hinwegwuchsen. Dabei wuchsen die neu formierten, GAP-43 positiven Axone innerhalb der dreidimensionalen Nervenmatrix nicht mehr parallel und geordnet, sondern nahmen eine jeweils individuelle, geschlängelte und gewundene Wachstumsrichtung ein, was eventuell auf das Fehlen von Lenkungsmolekülen sowie die repulsiven Eigenschaften der Glianarbe zurückzuführen ist. Die einzelnen regenerierenden Fasern konnten daher in ihrer gesamten Ausdehnung nicht vollständig erfasst werden. Um eine Quantifizierung der Regenerationsantwort zu ermöglichen, wurde die maximale Fläche GAP-43 positiver Axone in Relation zum Diameter des Nervus opticus bestimmt. Für die Gruppe der  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäuse konnte eine signifikante Zunahme der maximalen Regenerationsfläche pro 100  $\mu m$  Durchmesser des Nervus opticus festgestellt werden, wobei diese von 12857,51  $\mu m^2$  pro 100  $\mu m$  nervaler Diameter in den Kontrollen auf 30310,49  $\mu m^2$  pro 100  $\mu m$  nervaler Diameter unter transgener  $Bcl-X_L$  Überexpression in diesen Tieren anstieg (Abbildung 12). Das entspricht einer 2,4fachen Stimulation der Regenerationsantwort durch transgene

hBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Tα1α-Tubulinpromotor im Vergleich zu den Kontrolltieren.

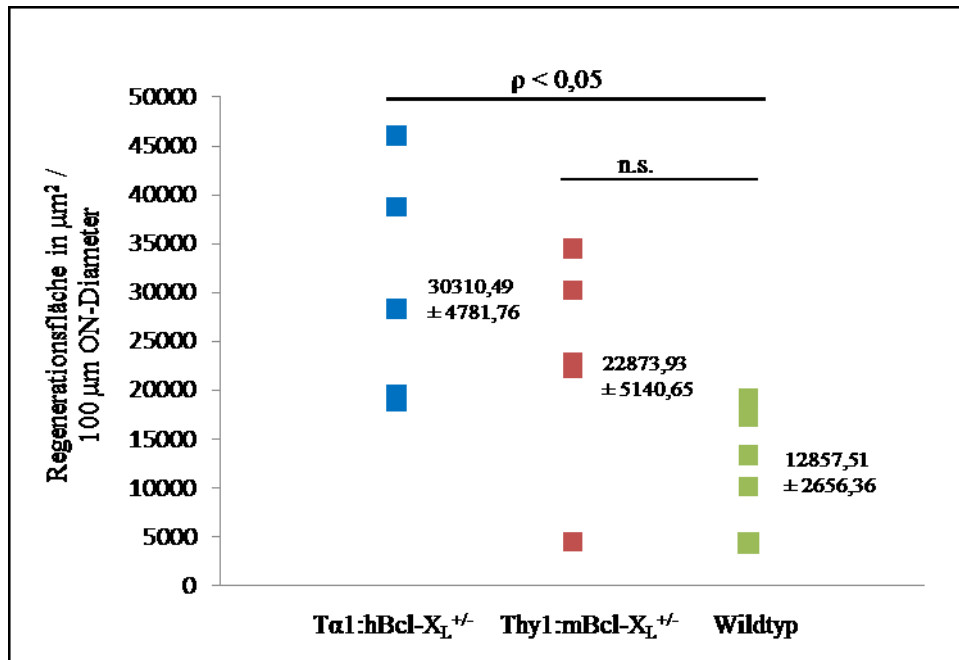
Für die Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse gelang der Nachweis einer translationalen, das gliöse Narbengewebe überbrückenden Axonelongation lediglich in zwei von fünf Fällen, wobei diese in ihren Dimensionen geringer ausgeprägt war als in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen. Insgesamt fiel in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen das Ausmaß der regenerativen Antwort weniger prägnant aus, was sich auch im proximalen Anteil des Nervus opticus zeigte. Die Mehrzahl der GAP-43 positiven Axone endete an der Läsionsstelle, ohne diese zu überbrücken. Die quantifizierende Analyse der Regenerationsfläche bestätigte diese Beobachtung. Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren bewirkte die transgene mBcl-X<sub>L</sub> Überexpression in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tieren eine Zunahme der maximalen Regenerationsfläche pro 100 µm nervaler Diameter auf 22873,99 µm<sup>2</sup> (Abbildung 12), die einer 1,8fachen Stimulation der Regenerationsantwort entspricht.

Da auch in den Wildtyp-Tieren GAP-43 positive Neuriten im proximalen Anteil des Nervus opticus nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass eine residuelle Bereitschaft zur Axoneogenese im adulten zentralen Nervensystem erhalten bleibt. In allen untersuchten Tieren stellten sich die aussprossenden Axone morphologisch vital und syntheseaktiv und partiell mit Wachstumskegeln dar.



**Abbildung 11:** Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus *in vivo* im  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  und  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp. Vergleich der transgenen Mauskonstrukte im Longitudinalschnitt.

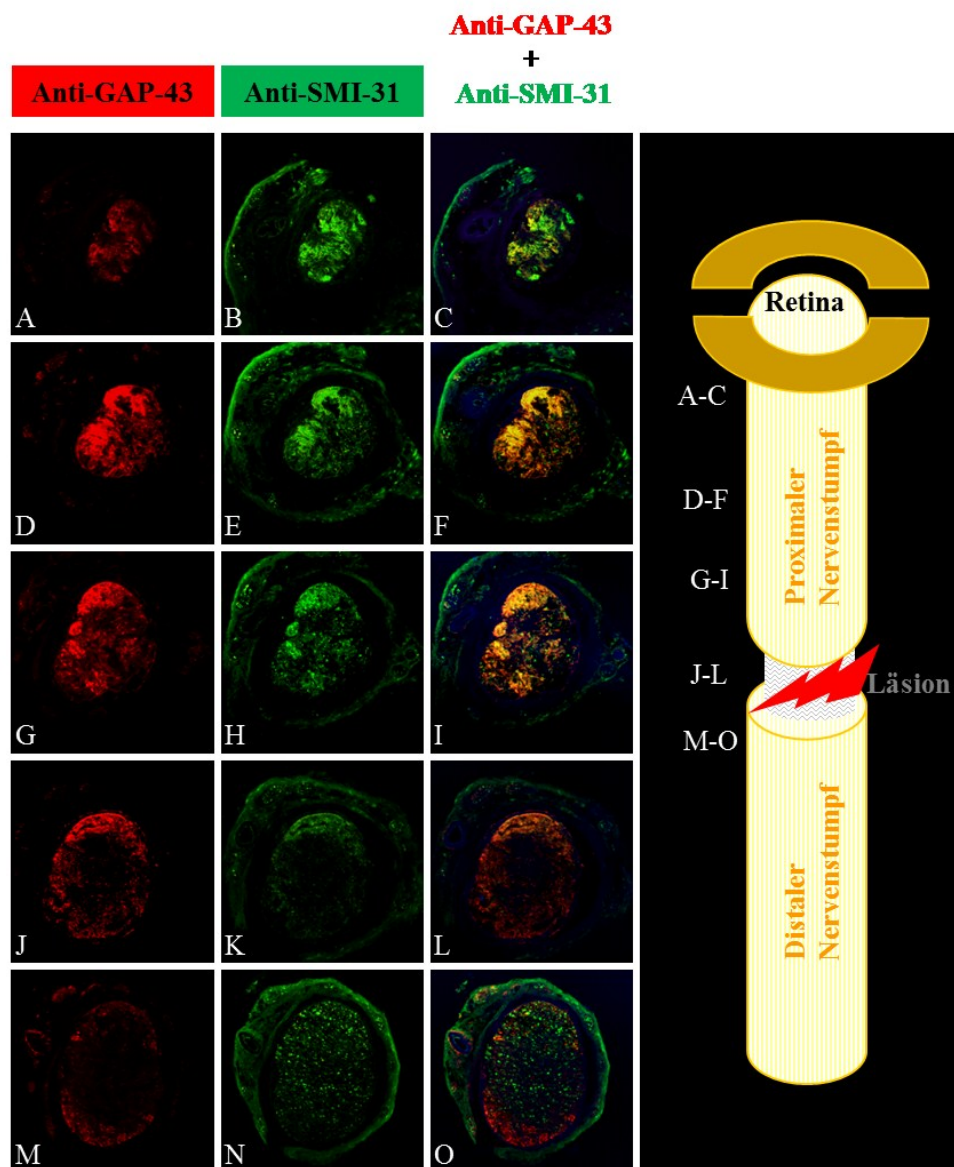
GAP-43 (A, D, G) und SMI-31 (B, E, H) positive Axone im Longitudinalschnitt des Nervus opticus 14 Tage nach Sehnervenquetschung in den transgenen  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  (A-C) und  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen (D-F) sowie den Wildtyp-Tieren (G-I). ★ Läsion.



**Abbildung 12: Quantifizierung axonaler Regeneration anhand des Wachstumsmarkers GAP-43 *in vivo*.**

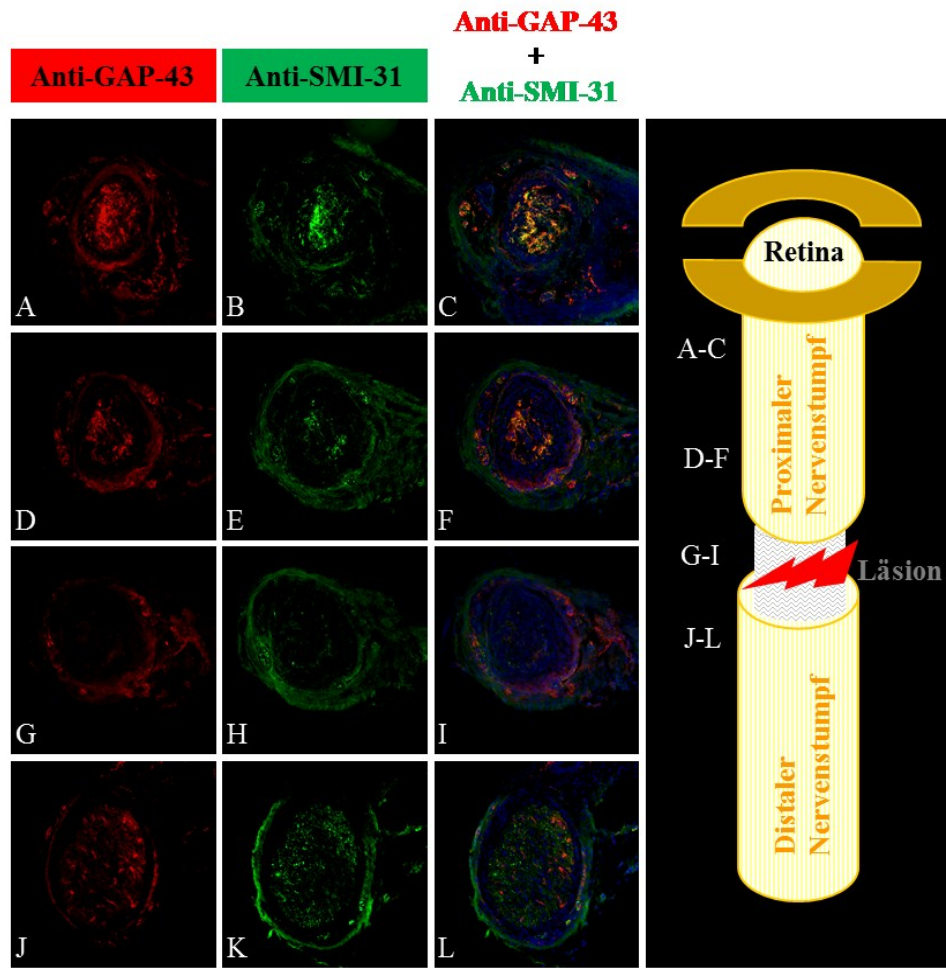
Um weitere Rückschlüsse auf die Dichte GAP-43 positiver Axone und deren Verlauf in der Nervenscheide zu ziehen, wurden für die Gruppe der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse, die das bessere Regenerationspotential aufwiesen, zusätzlich transversale Schnitte durch die Nervi optici 14 Tage nach Sehnervenquetschung analysiert. In den transversalen Schnittpräparaten des Nervus opticus kann deutlich zwischen präläsionalen (Abbildung 13A-13I und 14A-14F), intraläsionalen (Abbildung 13J-13L und 14G-14I) und postläsionalen (Abbildung 13M-13O und 14J-14L) Segmenten des Sehnervs differenziert werden. Hierbei bestätigte sich die im longitudinalen Schnittbild des Nervus opticus nach GAP-43 Markierung gemachte Beobachtung, dass im läsionierten Sehnerv transgener Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse *de novo* regenerierte Axone von dessen proximalen Anteil (Abbildung 13A-13I) über die Läsionsstelle hinweg (Abbildung 13J-13L) bis in den distalen Anteil (Abbildung 13M-13O) einwuchsen. Die Dichte der regenerierten Axone nahm nach distal hin ab. Während im proximalen Anteil etwa 75 % des Nervenquerschnittes ein GAP-43 positives Signal aufwies, wurden intraläsional und distal der Läsionsstelle bevorzugt in den Randbezirken des Nervus opticus GAP-43 positive Axone sichtbar. Dieser Gradient von proximal nach distal entspricht dem natürlichen Wachstumsverhalten und der physiologischen Wachstumsrichtung und spricht gegen isoliert distales Sprouting. Auffällig war dabei zusätzlich die verminderte Atrophie des Nervus opticus und die verzögerte Wallersche Degeneration der durchtrennten Axone in den transgenen Tieren, was durch die SMI-31 Markierung in Abbildung 13H, 13K und 13N im Vergleich zu Abbildung 14E, 14H und 14K deutlich wird.

Eine inkomplette Läsion als konkurrierende Ursache konnte ausgeschlossen werden, da die Läsionsstellen (Abbildung 13J-13L und 14G-14I) eine Schädigung sämtlicher axonaler Faszikel und die dazugehörigen Retinae im whole mount Präparat eine homogene, hochgradige Apoptose retinaler Ganglienzellen zeigten. Die Wildtyp-Tiere als Vergleichskontrolle wiesen ein rudimentäres Regenerations- sowie ein akzelliertes Degenerationsmuster auf (Abbildung 14). GAP-43 positive Axone erschienen ausschließlich im proximalen Nervenanteil; es war keine Regeneration über die Läsionsstelle hinweg zu beobachten. Morphologisch erschienen die Nervenfasern dystroph, avital und in ihren Faserkalibern verdünnt.



**Abbildung 13: Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus *in vivo* im  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  transgenen Tier. Transversalschnitt.**

GAP-43 und SMI-31 positive Axone im Transversalschnitt des Nervus opticus 14 Tage nach Sehnervenquetschung;  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  Maus (A-I: proximaler Anteil des Nervus opticus; J-L: Läsion; M-O: distaler Anteil des Nervus opticus).



**Abbildung 14: Stimulation der postläsionalen Regeneration des Nervus opticus *in vivo* im Wildtyp. Transversalschnitt.**

GAP-43 und SMI-31 positive Axone im Transversalschnitt des Nervus opticus 14 Tage nach Sehnervenquetschung; Wildtyp-Tier (A-F: proximaler Anteil des Nervus opticus; G-I: Läsion; J-L: distaler Anteil des Nervus opticus).



### 5.3. Neuroprotektion - Einfluss transgener Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression auf das Überleben axotomierter retinaler Ganglienzellen

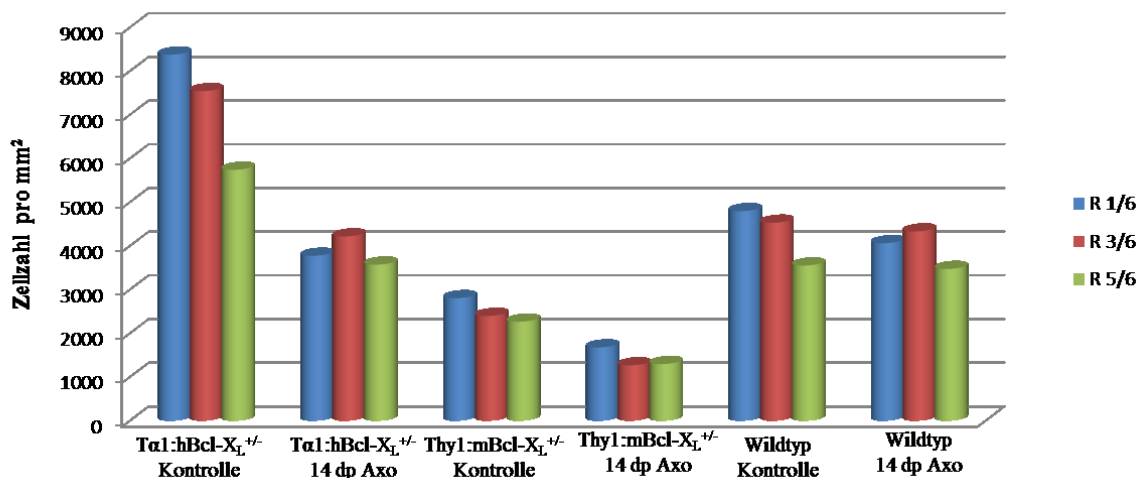
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression in retinalen Ganglienzellen in beiden transgenen Tiermodellen zu einer Stimulation axonalen Wachstums *in vitro* und *in vivo* nach Sehnervenquetschung führt, sollte die Rolle von Bcl-X<sub>L</sub> auf die Zellrettung retinaler Ganglienzellen untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob die erhöhte Anzahl an regenerierten Axonen in den transgenen Bcl-X<sub>L</sub> Tieren auf eine stimulierte Zellrettung („mehr Neurone, mehr Axone“) zurückzuführen ist beziehungsweise ob bei ähnlicher Anzahl an überlebenden Neuronen diese prozentual besser regenerieren als Neurone der Wildtyp-Tiere („gleich viel Neurone, mehr Axone“). Dabei wurde das in Ratten etablierte und standardisierte Protokoll der Arbeitsgruppe zur Quantifizierung von retinalen Ganglienzellen, durch retrograde Markierung mit dem Tracer Fluorogold, auf die Retina der Maus übertragen. Aufgrund der Größenreduzierten anatomischen und komplexen lokoregionären vaskulären Voraussetzungen am murinen Auge gestaltete sich jedoch der operative Eingriff der Axotomie technisch schwierig. Zusätzlich diffundierte der lipophile Tracer Fluorogold in das umliegende Gewebe, so dass es zu einer gleichzeitigen Markierung von Interneuronen in tieferen Schichten der Retina kam.

Es wurden am dritten und 14. postläsionalen Tag in je drei konstanten radiären Exzentrizitäten der vier retinalen Quadranten die unmittelbar nach Axotomie retrograd markierten, fluorogoldpositiven Zellen gezählt und anschließend deren mittlere Dichte bestimmt. Bereits die orientierende mikroskopische Beurteilung zeigte auffällig viele fluorogold-markierte Zellen, deren Abgrenzung zu Mikroglia und Interneuronen tieferer retinaler Schichten schwierig erschien. Bei der Quantifizierung fluorogoldpositiver Zellen konnten keine mit denen in der Literatur für murine Dichten retinaler Ganglienzellen beschriebenen Zellzahlen kompatible Messwerte erhoben werden (Abbildung 15). Die physiologische Verteilung der retinalen Ganglienzellen, die durch eine exzentrische Abnahme um den Faktor vier von zentral nach peripher gekennzeichnet ist (Drager und Olsen 1981), konnte nur tendenziell in der Kontrollkondition nachvollzogen werden.

Die quantifizierende Analyse retinaler Ganglienzellen 14 Tage nach Axotomie zeigte sowohl für die Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse als auch für die Wildtyp-Tiere fokal höhere Zelldichten in der Peripherie als zentral. Im Gruppenvergleich fanden sich zudem hohe Schwankungen in den radiusspezifischen Zelldichten. Diese reichten im inneren Radius (R 1/6) der Retina von durchschnittlich 8376 Zellen pro mm<sup>2</sup> in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen über 4060 Zellen

pro  $\text{mm}^2$  in den Wildtyp-Tiere bis zu physiologischen Dichtewerten von 2800 Zellen pro  $\text{mm}^2$  in den  $\text{Thy1:mBcl-X}_L^{+/-}$  Mäusen. Errechnete man die Gesamtzelldichte, so stimmte diese mit publizierten Vergleichswerten (Williams et al. 1996) nur für die  $\text{Thy1:mBcl-X}_L^{+/-}$  Mäuse mit 44785,56 retinalen Ganglienzellen pro Retina überein.

In Anbetracht der errechneten Dichtewerte retinaler Ganglienzellen von 44000 bis 129000 pro Retina unterlag ihre Anzahl starken Schwankungen mit unphysiologischen Maximalwerten sowohl innerhalb derselben sowie zwischen verschiedenen Mauslinien. Insgesamt sind die Ergebnisse als artifiziell bedingt anzusehen und auf technische Schwierigkeiten bei der retrograden Markierung mit Fluorogold zurückzuführen. Für den C57Bl/6 Stamm wird die Anzahl an retinalen Ganglienzellen mit 54600 bis 66100 Zellen pro Retina angegeben (Williams et al. 1996). Unter diesen Voraussetzungen wurde die vorgesehene Quantifizierung retinaler Ganglienzellen nicht fortgeführt. Eine neuronenspezifische Markierung retinaler Ganglienzellen mit dem Immunparameter TUJ1 ( $\beta$ III-Tubulin) würde einen alternativen und in der Literatur etablierten Ansatz darstellen; er wurde in dieser Arbeit allerdings nicht weiter verfolgt.



	$\text{Ta1:hBcl-X}_L^{+/-}$ Kontrolle ( $\pm$ SD)	$\text{Ta1:hBcl-X}_L^{+/-}$ 14 d p Axotomie ( $\pm$ SD)	$\text{Thy1:mBcl-X}_L^{+/-}$ Kontrolle ( $\pm$ SD)	$\text{Thy1:mBcl-X}_L^{+/-}$ 14 d p Axotomie ( $\pm$ SD)	Wildtyp Kontrolle ( $\pm$ SD)	Wildtyp 14 d p Axotomie ( $\pm$ SD)
<b>R 1/6</b>	8376,45 $\pm$ 715,82	3773,07 $\pm$ 128,89	2802,4 $\pm$ 484,95	1676,80 $\pm$ 174,19	4795,76 $\pm$ 477,97	4060,94 $\pm$ 420,56
<b>R 3/6</b>	7541,59 $\pm$ 818,26	4216,61 $\pm$ 289,16	2397,06 $\pm$ 169,52	1266,66 $\pm$ 248,44	4530,4 $\pm$ 843,63	4330,99 $\pm$ 585,30
<b>R 5/6</b>	5740,57 $\pm$ 215,63	3570,93 $\pm$ 195,27	2264,8 $\pm$ 118,47	1296 $\pm$ 284,75	3549,85 $\pm$ 855,2	3471,06 $\pm$ 877,29
<b>Zelldichte / Retina</b>	129951,66 $\pm$ 10498,26	69363,66 $\pm$ 3679,92	44785,56 $\pm$ 4637,64	25436,76 $\pm$ 4244,28	77256,06 $\pm$ 13060,8	71177,94 $\pm$ 11298,9

**Abbildung 15: Postläsionales Überleben läsionierter retinaler Ganglienzellen. Quantitative Analyse.**

Durchschnittliche Dichte überlebender retinaler Ganglienzellen pro  $\text{mm}^2$  in drei radialen Abschnitten von zentral R1/6 nach peripher R 5/6. Zu beachten ist, dass physiologischerweise die Dichte retinaler Ganglienzellen von zentral nach peripher abnimmt.



## 5.4. Morphologie und Lokalisation neuronaler Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression in der Retina

### 5.4.1. Induktion transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Transkription in adulten Neuronen der Retina

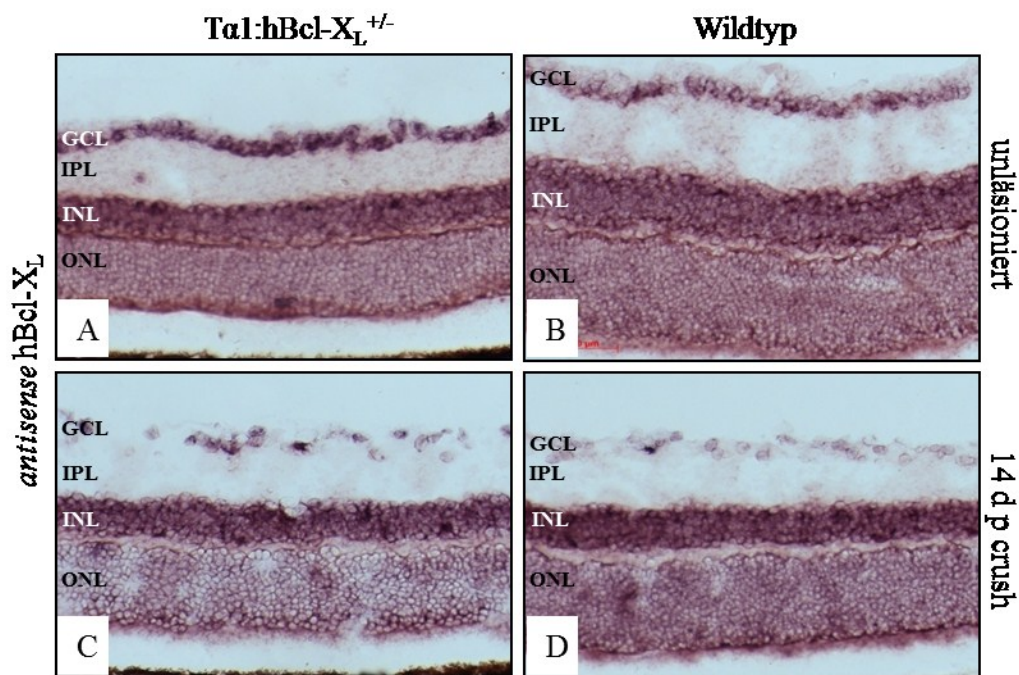
Um die zelluläre Verteilung der transgenen und endogenen Bcl-X<sub>L</sub> Transkription in der Retina adulter Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierender Mäuse zu charakterisieren, wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden verwendet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Region der Ganglienzellschicht in der Retina gelegt. In Anbetracht der Verwendung eines läsionsinduzierbaren Promotors in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> wurde insbesondere auch eine läsionsabhängige morphologische und quantitative Modulation der Transkription von Bcl-X<sub>L</sub> mRNA berücksichtigt.

Es wurden zwei differente *antisense* Sonden generiert, die sich in Ihrer Spezifität unterschieden: Die *antisense* hBcl-X<sub>L</sub>-Sonde detektiert *in vivo* endogene und transgene Bcl-X<sub>L</sub> mRNA, wohingegen die *antisense* KS/SV 40 p A1 Sonde ausschließlich transgene Bcl-X<sub>L</sub> mRNA erkennt.

Die hBcl-X<sub>L</sub>-Sonde stellte Bcl-X<sub>L</sub> mRNA positive Zellen in allen drei nukleären Schichten der Retina, der äußeren nukleären Schicht, der inneren nukleären Schicht und der Ganglienzellschicht, dar. Somit war von einer Transkription endogener und transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA in den Zapfen und Stäbchen der Photorezeptoren, in den Bipolarzellen, in den Amakrinzellen und in den retinalen Ganglienzellen in den adulten Tieren auszugehen. Das Signal in den retinalen Ganglienzellen imponierte nicht rein nukleär, sondern schloss das Zytoplasma mit ein. Nativ unterschied sich die Retina der adulten transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mäuse (Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup>) von den Wildtyp-Tieren durch den Eindruck eines erhöhten Transkriptionsniveaus an endogener und transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA in allen drei nukleären Schichten. Der Eindruck eines erhöhten Transkriptionsniveaus generierte sich aus einer stärkeren Signalintensität des *in situ*-Hybridisierungssignals bei vergleichbarem Hintergrundlevel. Insbesondere imponierte das nukleäre Transkriptionssignal in den retinalen Ganglienzellen der transgenen Tiere stärker als in denen der Wildtyp-Tiere (Abbildung 16A und 16B).

14 Tage nach Sehnervenquetschung zeigte sich im Rahmen der Apoptose erwartungsgemäß eine ausgeprägte Verminderung an Bcl-X<sub>L</sub> mRNA positiven retinalen Ganglienzellen. Da die Läsion des Nervus opticus lediglich zu einer Apoptose von retinalen Ganglienzellen führt und alle nachgeschalteten Neurone unbeeinträchtigt lässt, ergab sich postläsional keine

Signalveränderung in der inneren und äußeren nukleären Schicht. Während das nukleäre Signal in den retinalen Ganglienzellen der transgenen Tiere weiterhin kräftig erschien, führte die Läsion zu einer verminderten zytoplasmatischen Signalintensität in retinalen Ganglienzellen der  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Maus sowie zu einer Abschwächung der Signalintensität im Zytoplasma und im Zellkern in den Wildtyp-Tieren. Die retinalen Ganglienzellen der  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäuse erschienen vitaler und syntheseaktiver im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 16C und 16D).



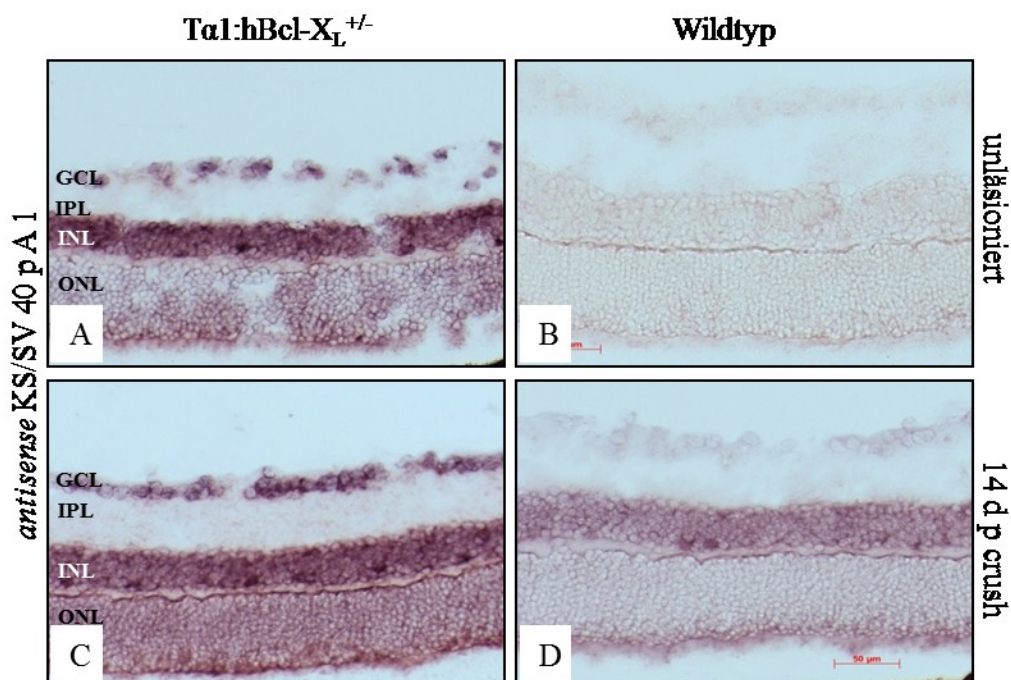
**Abbildung 16:** *In situ*-Hybridisierung zur Detektion endogener und transgener Bcl- $X_L$  mRNA Transkripte mittels *antisense* hBcl- $X_L$ -Sonde nativ (A und B) sowie postläsional (C und D).

Transkription endogener und transgener Bcl- $X_L$  mRNA in adulten  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen und Wildtyp-Tieren mittels DIG-markierter *antisense* hBcl- $X_L$ -RNA Sonde unter Nativbedingungen und 14 Tage nach Sehnervenquetschung.

Die *in situ*-Hybridisierung nativer Retinae mittels DIG-markierter *antisense* KS/SV 40 p A1 Sonde zur isolierten Detektion transgener hBcl- $X_L$  mRNA zeigte ein positives Transkriptionssignal in den Neuronen der Ganglienzellschicht und der inneren und äußeren nukleären Schicht der Retina der  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäuse (Abbildung 17A und 17C). Die Spezifität der *antisense* KS/SV 40 p A1 Sonde wurde durch das vollständige Fehlen eines Transkriptionssignals in der Retina der Wildtyp-Tiere verdeutlicht (Abbildung 17B und 17D). Eine postläsionale Induktion transgener hBcl- $X_L$  mRNA 14 Tage nach Sehnervenquetschung zeigte sich, die Anzahl Signal-positiver Zellen in der Ganglienzellschicht der  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäuse nahm um das Vierfache zu. In der unläsionierten Retina wurden 6,72 positive Zellen

pro mm detektiert. Die Läsion bewirkte eine Zunahme auf 24,29 positive Zellen pro mm in der retinalen Ganglienzellschicht 14 Tage nach der Sehnervenquetschung. Unter der Annahme, dass 14 Tage nach der Läsion noch cirka 20 % an retinalen Ganglienzellen am Leben waren, entsprach dies einer Steigerung auf das 20fache gegenüber der Nativsituation. Ähnlich wie bei der Markierung mit der *antisense* hBcl-X<sub>L</sub>-Sonde fiel das nukleäre Signal prominenter als das zytoplasmatische Signal aus. In den Wildtyp-Tieren wurde keine spezifische Transkription detektiert (Abbildung 17B und 17D).

Die Detektion transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Transkription mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung war für die Gruppe der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse nicht möglich, da die für die Sondengenerierung notwendigen Plasmide nicht zur Verfügung standen.



**Abbildung 17:** *In situ*-Hybridisierung zur Detektion humaner (transgener) Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Transkripte mittels KS/SV 40 p A1 Sonde nativ (A und B) sowie postläsional (C und D).

Transkription transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA in adulten Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen und Wildtyp-Tieren mittels DIG-markierter *antisense* KS/SV 40 p A1 RNA-Sonde unter Nativbedingungen und 14 Tage nach Sehnervenquetschung.

#### 5.4.2. Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression der Retina in der Immunhistochemie

Da mit der *in situ*-Hybridisierung die Hochregulierung der mRNA Transkription, jedoch nicht die Lokalisation und Regulation der Proteinexpression nachgewiesen werden kann, wurde eine Immunfärbung gegen Bcl-X<sub>L</sub> an koronaren Kryoschnittpräparaten der Retina ergänzt.

Für die transgene hBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Tα1α-Tubulinpromotor gab es im Gegensatz zur transgenen mBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Thy1-Promotor Hinweise auf eine postläsionale Induktion im adulten Tier. In Abbildung 18 sind immunhistochemische Färbungen zur Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression der Retina nativ und nach Sehnervenquetschung in den beiden transgenen Bcl-X<sub>L</sub> Mauslinien und im Wildtyp-Tier vergleichend dargestellt. Morphologisch konnten die Ganglienzellschicht sowie die innere und äußere nukleäre Schicht in der Retina von Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und von Wildtyp-Mäusen sowie die Ganglienzellschicht und die innere nukleäre Schicht in der Retina der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mauslinie als Zone relevanter Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression detektiert werden.

Mit Hilfe der Zellkerngegenfärbung mit DAPI konnte eindeutig die nukleäre Lokalisation der Bcl-X<sub>L</sub> Expression gezeigt werden. Für die Gruppe der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse wurde deutlich, dass es zu einer Aktivierung der Bcl-X<sub>L</sub> Expression in retinalen Ganglienzellen 14 Tage nach Quetschung des Nervus opticus kam. Erst postläsional ließ sich ein positives Bcl-X<sub>L</sub> Proteinsignal in den Zellen der retinalen Ganglienzellschicht in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen nachweisen, was mit der erwähnten läsionsabhängigen Induktion des Tα1α-Tubulinpromotors korrelierte (Abbildung 18A und 18B). Da in den Wildtyp-Tieren die Läsion nicht zu einer Induktion der endogenen Bcl-X<sub>L</sub> Expression in den Zellen der retinalen Ganglienzellschicht führte, ist davon auszugehen, dass primär transgenes Bcl-X<sub>L</sub> postläsional hochreguliert wurde (Abbildung 18 E und 18F). Für die Zellen der inneren und äußeren nukleären Schicht konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, da diese Zellen von der Läsion unbeeinträchtigt bleiben.

Die abgeschätzte Dichte der Bcl-X<sub>L</sub> markierten Zellen der retinalen Ganglienzellschicht in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen nahm im postläsionalen Verlauf ab, vermutlich aufgrund von apoptotischem Zelluntergang (Abbildung 18C und 18D). Eine postläsionale Induktion von Bcl-X<sub>L</sub> setzte in diesen Tieren nicht ein, was mit der negativen Regulation der Bcl-X<sub>L</sub> Expression in den Wildtyp-Tieren korrelierte.

Vergleichende Analysen legten unter Abschätzung der jeweiligen Dichte an signalpositiven Zellen in der Ganglienzellschicht nahe, dass in den beiden Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien die Dichte immunreaktiver Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nativ und postläsional höher ist. Der Vergleich zwischen den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen zeigte eine erhöhte Immunreaktivität in der nativen Ganglienzellschicht der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse, so dass von einer erhöhten nativen Bcl-X<sub>L</sub> Expressionseffizienz durch den Thy1-Promotor ausgegangen werden kann. Postläsional verhielt sich das Expressionslevel umkehrt zur nativen Situation. Die postläsionale Induktion von Bcl-X<sub>L</sub> in

den  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Tieren überwog die Apoptose-bedingte Abnahme an signalpositiven Zellen in der Ganglienzellschicht und damit die Anzahl  $Bcl-X_L$  positiver retinaler Ganglienzellen in den  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen. Ob es dabei in den  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Tieren zusätzlich zu einer induktionsbedingten verbesserten Zellrettung kommt, konnte aktuell infolge der Artefakte in der Quantifikation retinaler Ganglienzellen (Kapitel 5.3) nicht geklärt werden.

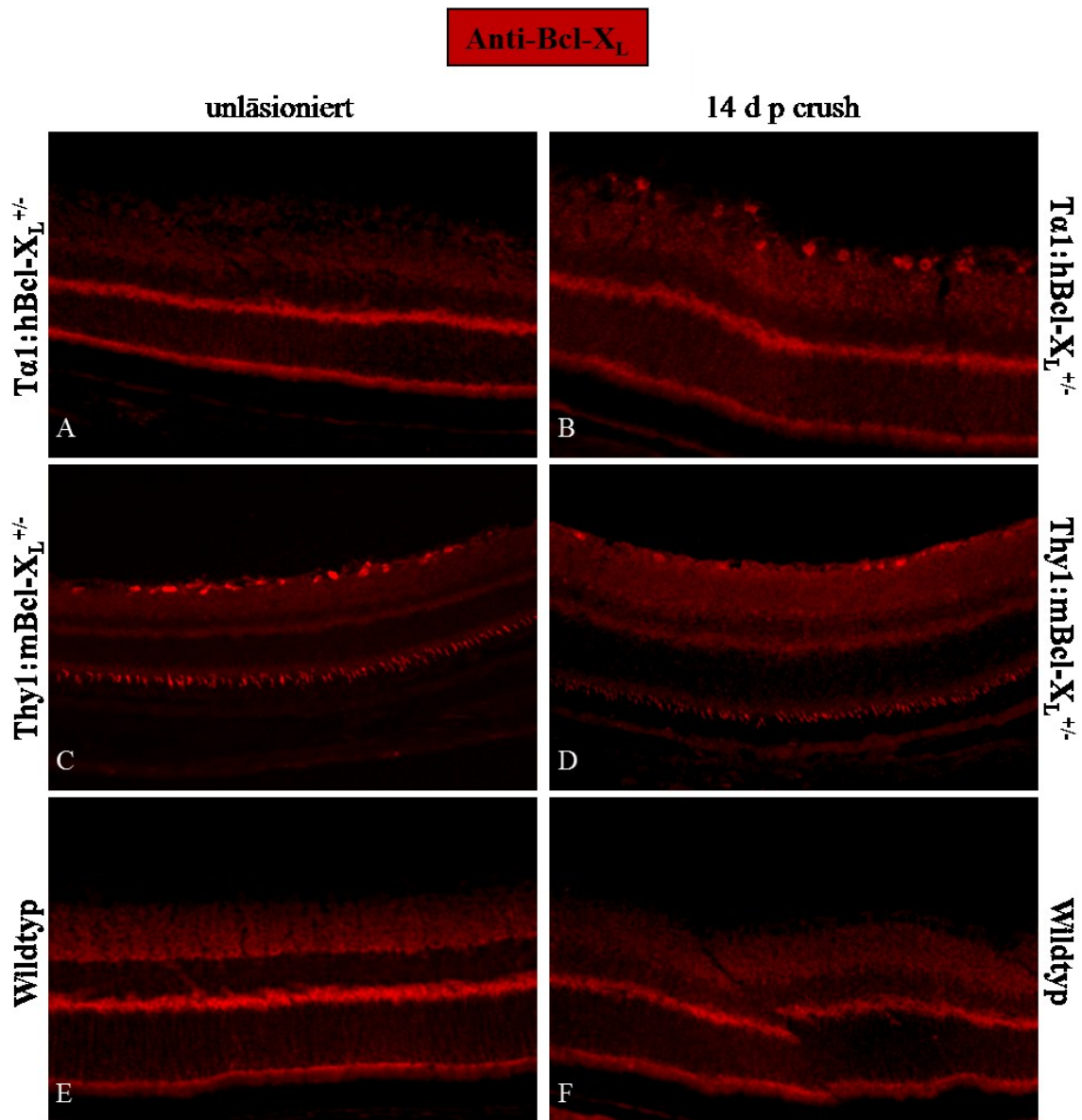


Abbildung 18: Prä- und postläsionale Bcl-X<sub>L</sub> Expression in der Retina.

## 5.5. Regulation der postläsionalen Bcl-X<sub>L</sub> Expression

Ergänzend zur Immunhistochemie wurde die native und postläsionale retinale Expression des Bcl-X<sub>L</sub> Proteins mittels Western Blot analysiert. Um Expressionsniveau und Kinetik der Bcl-X<sub>L</sub> Regulation detailliert zu erfassen, wurde für die postläsionale Proteinextraktion eine engmaschige Zeitreihe (Tag 3, 5, 7 und 14 nach der Läsion) gewählt.

Entsprechend der Beobachtung in der Immunhistochemie unterschied sich die native retinale Proteinexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen nicht wesentlich vom Bcl-X<sub>L</sub> Niveau in den unläsionierten Wildtyp-Tieren (Abbildung 19.1 und 19.2).

Auch in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen fand sich ein gegenüber den unläsionierten Wildtyp-Kontrollen nur geringfügig stärkeres retinales Bcl-X<sub>L</sub> Expressionsniveau (Abbildung 19.1 und 19.2). In der Immunhistochemie hingegen exprimierten in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen deutlich mehr Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht Bcl-X<sub>L</sub> als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 18C bis 18F). Diese Beobachtung mag dadurch zu erklären sein, dass die retinalen Ganglienzellen nur etwa ein Prozent aller retinalen Zellen darstellen und ein Expressionsunterschied unter der Verwendung von Proteinlysaten der gesamten Retina nur schwer detektierbar ist.

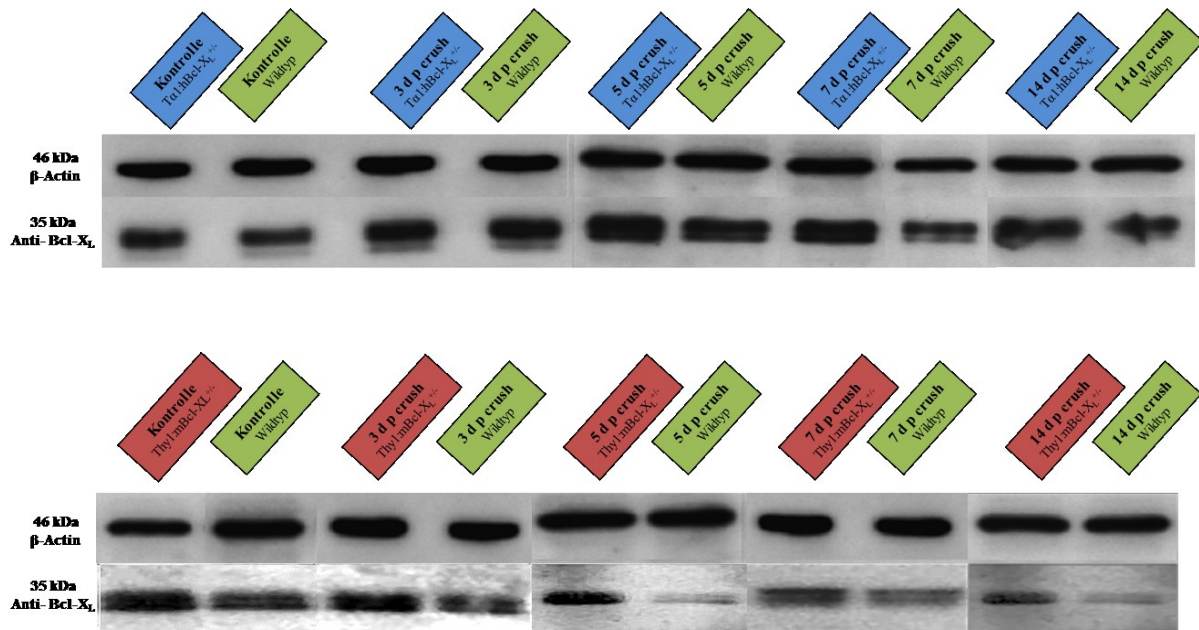
Beide Mauslinien, sowohl das Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> als auch das Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mauskonstrukt, zeigten jedoch im zeitlichen Verlauf nach Sehnervenquetschung eine signifikant höhere retinale Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression als die Wildtyp-Tiere. In der Retina von Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen fand sich nach der Läsion des Sehnerven eine signifikante Stimulation der Bcl-X<sub>L</sub> Expression ab dem fünften Tag nach dem Ereignis. Diese Induktion hielt bis zum Versuchsende, dem 14. Tag an und war in ihrer Tendenz zunehmend (Abbildung 19.1 und 19.2). Eine postläsionale Bcl-X<sub>L</sub> Induktion war korrelierend auch in den Untersuchungen der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Transkription beobachtet worden (Abbildung 17).

In der Retina der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse zeigte sich eine geringe Abnahme der Bcl-X<sub>L</sub> Expression im postläsionalen Verlauf ab dem fünften Tag nach Sehnervenquetschung. Eine Deklination der Bcl-X<sub>L</sub> Expression war in den Wildtyp-Tieren bereits ab dem dritten postläsionalen Tag zu detektieren, wobei diese Regulation durch das Einsetzen der Apoptose mit dem Verlust der Bcl-X<sub>L</sub> exprimierenden retinalen Ganglienzellen zu erklären ist (Abbildung 19.1 und 19.2). Frühere Studien der Arbeitsgruppe konnten zudem eine Reduktion des endogenen Bcl-X<sub>L</sub> Gehalts in läsionierten retinalen Ganglienzellen beobachten (Isenmann et al. 1997).

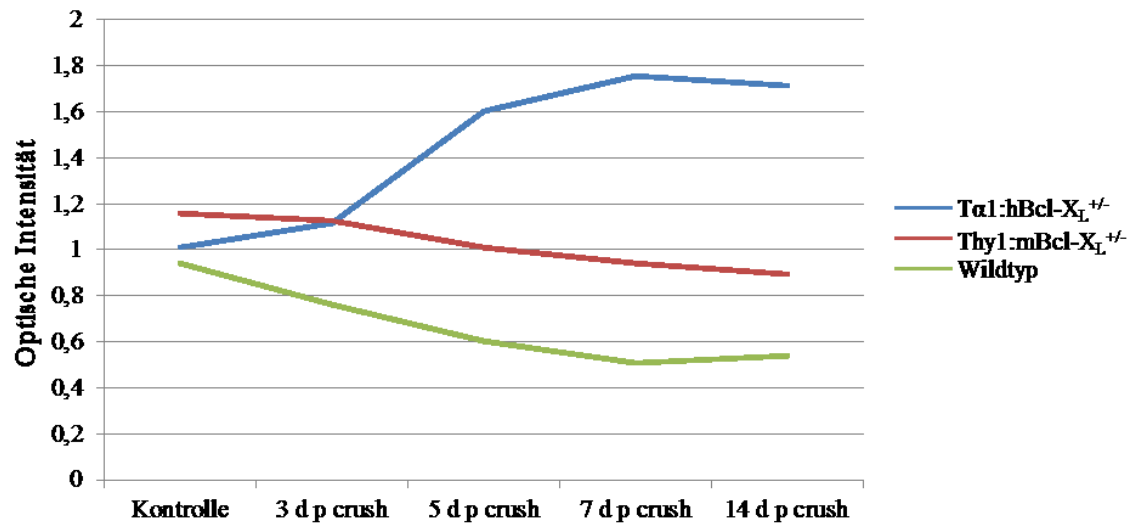


Insgesamt korrelierten die Beobachtungen aus den Western Blot Analysen mit den Transkriptionsanalysen sowie den Ergebnissen der Immunhistochemie und bestätigten erneut die Induktion von transgenem Bcl-X<sub>L</sub> unter der Kontrolle des läsionsinduzierbaren Tα1α-Tubulinpromotors. Die Hochregulation der Expression des Bcl-X<sub>L</sub> Proteins fand zeitlich koinzident mit den beobachteten progenerativen Effekten *in vitro* statt.

Auch für die Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse korrelierten die Ergebnisse aus den Western Blot Analysen mit denen der Immunhistochemie und bestätigten die hohe Bcl-X<sub>L</sub> Expression in der nativen Retina und die am ehesten apoptosebedingte postläsionale Expressionsabnahme. Dieser Regulationsunterschied könnte die eingeschränkten Stimulationseffekte auf die axonale Regeneration im Vergleich zu den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen erklären.



**Abbildung 19.1:** Regulation der Bcl-X<sub>L</sub> Expression in der Retina von Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tieren sowie den Wildtyp-Tieren. Exemplarisch (n = 1 je Mauslinie und Kondition).



	Kontrolle Optische Intensität (± SD)	3 d p crush Optische Intensität (± SD)	5 d p crush Optische Intensität (± SD)	7 d p crush Optische Intensität (± SD)	14 d p crush Optische Intensität (± SD)
Ta1:hBcl-XL <sup>+/-</sup>	1,01 ± 0,15	1,11 ± 0,14	1,6 ± 0,12	1,76 ± 0,19	1,72 ± 0,21
Thy1:mBcl-XL <sup>+/-</sup>	1,16 ± 0,09	1,12 ± 0,13	1,00 ± 0,18	0,94 ± 0,05	0,89 ± 0,17
Wildtyp	0,94 ± 0,08	0,76 ± 0,11	0,60 ± 0,11	0,51 ± 0,23	0,54 ± 0,14

	Kontrolle Optische Intensität (± SD)	3 d p crush Optische Intensität (± SD)	5 d p crush Optische Intensität (± SD)	7 d p crush Optische Intensität (± SD)	14 d p crush Optische Intensität (± SD)
Ta1:hBcl-XL <sup>+/-</sup> versus Wildtyp	n.s.	ρ < 0,05	ρ < 0,001	ρ < 0,001	ρ < 0,001
Thy1:mBcl-XL <sup>+/-</sup> versus Wildtyp	ρ < 0,05	ρ < 0,05	ρ < 0,05	ρ < 0,05	ρ < 0,05
Ta1:hBcl-XL <sup>+/-</sup> versus Thy1:mBcl-XL <sup>+/-</sup>	n.s.	n.s.	ρ < 0,001	ρ < 0,001	ρ < 0,001

Abbildung 19.2: Statistische Analyse der Quantifizierung der Regulation der Bcl-X<sub>L</sub> Expression in der Retina von Ta1:hBcl-XL<sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-XL<sup>+/-</sup> Tieren sowie den Wildtyp-Tieren (n = 3 je Mauslinie und Kondition).



## 6. Diskussion

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem verfügt das zentrale Nervensystem adulter Vertebraten nur über eingeschränkte zelluläre und axonale Regenerationsmöglichkeiten, um Läsionsschäden zu reparieren. Schädigende Einflüsse hypoxischer, traumatischer, degenerativer oder metabolisch-toxischer Genese führen im zentralen Nervensystem meist nicht zu einer strukturellen und funktionellen Restitution, sondern oft zu einem signifikanten neurologischen Defizit. Die Gründe und Mechanismen für diesen Unterschied sind nicht vollständig verstanden. Anerkannt und in zahlreichen Studien belegt ist, dass das Regenerationspotential adulter Nervenzellen von einem komplexen Zusammenspiel extrinsischer und intrinsischer Faktoren abhängig ist, wobei in Abhängigkeit der Maturation des zentralen Nervensystems restriktive und nonpermissive Faktoren gegenüber proregenerativen Faktoren überwiegen.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde gezeigt, dass die endogene Überexpression des Genproduktes Bcl-X<sub>L</sub> in adulten retinalen Ganglienzellen intrinsische Regenerationsprozesse vermitteln und neuronales Wachstum *in vitro* und *in vivo* induzieren kann. Die Frage, ob die Erhöhung des intrinsischen Regenerationspotentials mit den bereits bekannten antiapoptotischen Eigenschaften von Bcl-X<sub>L</sub> verbunden ist, konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Zur Analyse einer endogenen Einflussnahme von Bcl-X<sub>L</sub> auf das Apoptose- und Regenerationsverhalten adulter retinaler Ganglienzellen wurden zwei Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierende Mausmodelle eingesetzt und verglichen. Im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren war bei fehlender Manipulation extrinsischer Bedingungen, wie beispielsweise der Neurotrophinzufuhr *in vitro* oder die narbige Gewebeveränderungen im Läsionsareal *in vivo*, die selektive Untersuchung des zellintrinsischen Genproduktes Bcl-X<sub>L</sub> und seiner Funktion im zentralen Nervensystem *in vivo* möglich.

### 6.1. Einfluss der transgenen Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression in der Retina

Zur Beantwortung der Frage und zur Analyse einer endogenen Einflussnahme von Bcl-X<sub>L</sub> auf ein potentielles Gleichgewicht zwischen Zelltod, Überleben und Regeneration wurden zwei Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierende Mausmodelle verwendet (Wiessner et al. 1999, Parsadanian et al. 1998). In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss der transgen bedingten Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression auf einen potentiellen neuronalen Phänotyp in der adulten nativen Retina untersucht. Für das Protoonkogen Bcl-X<sub>L</sub> ist bekannt, dass es große Strukturhomologien zu

Bcl-2 aufweist und den programmierten Zelltod inhibieren kann (Minn et al. 1997, Krajewski et al. 1994, Krajewska et al. 1996). Eine transgene Überexpression von Bcl-2 führt zu einer Reduktion des natürlich vorkommenden Zelltodes während der Embryonalentwicklung und zu einer um etwa 40 % erhöhten Population unterschiedlicher Neurone, wie zum Beispiel von Purkinje-Zellen und retinalen Ganglienzellen (Garcia et al. 1992, Martinou et al. 1994a, Martinou et al. 1994b, Zanjani et al. 1996, Zanjani et al. 1997). Ebenso konnte in diesen Tieren eine verminderte läsionsbedingte Apoptose nach experimenteller kortikaler Ischämie mit einer Reduzierung des Infarkt Volumens um 43 % nachgewiesen werden (Martinou et al. 1994a).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein spezifischer neuronaler Phänotyp unter transgener Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in der adulten Retina detektiert werden. Insbesondere ergaben sich keine Hinweise auf spezifische Unterschiede in der Zytoarchitektur und Morphologie der adulten Retina. Die zwei transgenen Mauslinien Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> sowie die Wildtyp-Tiere zeigten einen identischen Schichtaufbau der adulten Retina mit einer eindeutigen Abgrenzbarkeit der Ganglienzellschicht, der inneren plexiformen Schicht, der inneren nukleären Schicht, der äußeren plexiformen Schicht, der äußeren nukleären Schicht und den Photorezeptoren (Abbildung 7). Die vergleichende Quantifizierung retinaler Ganglienzellen gelang aus technischen Gründen leider nicht (Kapitel 5.3 und Abbildung 15). Hinweise für eine retinale Hypertrophie fanden sich nicht (Abbildung 8). In früheren Arbeiten konnte mit Hilfe des auch in dieser Arbeit verwendeten Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Modells ein erhöhtes Überleben von Nervenzellen im Hippocampus, Striatum und Cortex verbunden mit einer Reduzierung des Infarkt Volumens um etwa 50 % nach experimenteller Ischämie in der postnatalen Periode nachgewiesen werden. Ein nativer neuronaler Phänotyp war hierbei nicht aufgefallen (Parsadanian et al. 1998). Korrelierend war für das Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Konstrukt eine signifikante Reduktion der Infarktgröße um 21 % nach MCAO (middle cerebral artery occlusion) in adulten Mäusen gezeigt worden, wobei hier und in der Literatur ebenfalls keine weiteren Hinweise auf einen nativen neuronalen Phänotyp aufgeführt wurden (Wiessner et al. 1999). Wiessner und Kollegen konnten in ihrer Studie zusätzlich die Bedeutung von Bcl-X<sub>L</sub> für den Erhalt neuronaler Lebensfähigkeit in der Adoleszenz im Vergleich zu Bcl-2 belegen. Der Vergleich der zwei antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> durch transgene Überexpression unter einem von der Entwicklung und Reifung unabhängigen neuronalen Promotor zeigte deutlich, dass nur die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> zu einer Reduzierung der Infarktgröße im Vergleich zu den Wildtypen führte (Wiessner et al. 1999). Weiterhin zeigten Versuche an adulten Tieren, bei denen das Bcl-2 Gen ausgeschaltet wurde, dass Bcl-2 für den

Erhalt des muren zentralen Nervensystems nicht von Bedeutung ist (Boise et al. 1993). Im Vergleich dazu führt die Ausschaltung des Bcl-X<sub>L</sub> Genes zu einem massiven apoptotischen Zelluntergang, der mit einem letalen Phänotyp in der Embryonalperiode verbunden ist (Motoyama et al. 1995).

Diese Ergebnisse belegen, dass Bcl-X<sub>L</sub> eine entscheidende Rolle in der Regulation der Apoptose im adulten zentralen Nervensystem besitzt. Auch eine Beteiligung an der Steuerung von Regenerationsmechanismen scheint naheliegend, sodass das gewählte transgene Mausmodell eine vielversprechende Methode zur Untersuchung neuronaler Apoptose und Regeneration im adulten zentralen Nervensystem darstellt.

In einem zweiten Ansatz wurden immunhistochemische Färbungen und Western Blots gegen Bcl-X<sub>L</sub> durchgeführt, um Erkenntnisse über die Verteilung und zeitliche Dynamik endogener und transgener Bcl-X<sub>L</sub> Expression in der Retina der Maus nativ sowie postläsional zu gewinnen. Für die Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Maus erfolgte zusätzlich eine Transkriptionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung durch DIG-markierte RNA-Sonden. Es wurden zwei differente *antisense* Sonden eingesetzt, die sich in Ihrer Spezifität unterschieden. Bcl-X<sub>L</sub> wurde in den beiden transgenen Mauslinien selektiv in Neuronen überexprimiert. Kenntnisse über die zelluläre Distribution des Bcl-X<sub>L</sub> Proteins in der nativen Retina sind für das Verständnis der postläsionalen regenerativen Antwort essentiell. Mittels immunhistochemischer Methoden konnte die Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression in den drei nukleären Schichten der nativen Retina nachgewiesen werden. In der nativen Retina von Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Wildtyp-Tieren konnten die innere und äußere nukleäre Schicht, in der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Maus die Ganglienzellschicht und die innere nukleäre Schicht als Zone relevanter Bcl-X<sub>L</sub> Expression identifiziert werden. Sowohl in der Immunhistochemie als auch im Western Blot zeigte sich in den transgenen Tieren beider Stämme ein retinal höheres Expressionsniveau von Bcl-X<sub>L</sub> als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 18 und 19). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Levin et al. 1997). Das Bcl-X<sub>L</sub> Protein konnte bereits im Vorfeld in der inneren und äußeren nukleären Schicht und auf den Axonen der Interneurone nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten Levin et al. durch einen Vergleich der beiden antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder, Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2, das Bcl-X<sub>L</sub> Protein als dominierendes Genprodukt in der Retina identifizieren, welches dort gegenüber der Expression von Bcl-2 16fach überwiegt. (Levin et al. 1997). Zusätzlich unterstreicht dieser retinale Schwerpunkt der Bcl-X<sub>L</sub> Expression die Bedeutung der Quetschläsion des Nervus opticus und der damit verbundenen selektiven Degeneration an retinalen Ganglienzellen und ihren Axonen als präferiertes Läsionsmodell.

Postläsional ergab sich in den retinalen Ganglienzellen der überexprimierenden transgenen Mauslinien  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  und  $Thy1:mBcl-X_L^{+/-}$  im untersuchten Zeitfenster von 14 Tagen weiterhin eine höhere Bcl- $X_L$  Expression als in den Wildtyp-Kontrollen. Dabei zeigte die postläsionale Bcl- $X_L$  Expression in den beiden transgenen Mauslinien jedoch eine zeitlich unterschiedliche Kinetik.

#### Postläsionale Kinetik der Bcl- $X_L$ Expression der $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ Maus:

Die transgene Überexpression von Bcl- $X_L$  in retinalen Ganglienzellen unter dem  $T\alpha 1\alpha$ -Tubulinpromotor war postläsional induzierbar. Diese Induktion war auf der Ebene der mRNA Transkription und auf Proteinebene nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass lediglich das transgene Bcl- $X_L$  Produkt induziert wurde, da die endogene Bcl- $X_L$  Proteinexpression aufgrund der retrograden Degeneration retinaler Ganglienzellen bereits vier Tage nach Sehnervenquetschung um etwa 30 % absinkt (Isenmann et al. 1997, Levin et al. 1997). Dies bedeutet, dass die Induktion des transgenen Bcl- $X_L$  Proteinproduktes dabei mehr als 30 % des endogenen Bcl- $X_L$  Expressionsniveaus betragen muss. Durch die Induktion ergab sich eine Möglichkeit, der durch die Läsion sonst irreversibel eingeleiteten Todeskaskade und nachfolgender Gewebeschädigung entgegenzuwirken. Im Gegensatz zu Neurotrophenen oder vektortransduzierten Minigenen, die nur eine kurze Halbwertszeit ihrer effizienten Wirkung beziehungsweise Expression besitzen, konnte zudem eine stabile, das zeitliche Maximum des Degenerationsprozesses umfassende Induktion von Bcl- $X_L$  herbeigeführt werden. Der Beginn dieser Geninduktion lag zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Läsion, das heißt sie setzte koinzident mit den bereits gut charakterisierten apoptotischen Prozessen ein. Auch diese zeitlich günstige Kinetik der transgenen Bcl- $X_L$  Induktion legte einen Effekt auf zelluläres Überleben oder andere restaurative Reaktionen nahe. Die Induktion transgener Bcl- $X_L$  Proteinexpression findet sich im genetischen Konstrukt der  $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$  Maus begründet. Dabei sei auf Arbeiten von Parsadanian et al. verwiesen, in denen humanes Bcl- $X_L$  unter Kopplung an ein Reportergen unter der Kontrolle eines 8,5 kbp langen  $T\alpha 1\alpha$ -Tubulinpromotorfragmentes ( $T\alpha 1:hBcl-X_L^{+/-}$ ) in einem Mausmodell überexprimiert wurde (Parsadanian et al. 1998). Durch die Wahl des Promotors werden Ort, Menge und Dynamik der Gen- und Proteinexpression bestimmt. Der Promotor fungiert als eine regulatorische Nukleinsäuresequenz, die wie ein „Genschalter“ das gewebespezifische und zelluläre Expressionsmuster des Zielgens bestimmt. Das spezifische Expressionsmuster von Bcl- $X_L$  unter dem auch in der aktuellen Arbeit verwendeten  $T\alpha 1\alpha$ -Tubulinpromotors wurde durch seine Kopplung an das lacZ Reportergen sehr gut charakterisiert (Gloster et al. 1994, Majdan et al. 1997). Unter der Kontrolle des

Ta1 $\alpha$ -Tubulinpromotors konnte eine stabile Expression des lacZ Reportergens und damit indirekt von Bcl-X<sub>L</sub> in Neuronen des zentralen Nervensystems inklusive der retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden. Visualisiert wurde die lokoregionäre Expression von Bcl-X<sub>L</sub> indirekt durch eine histochemische Blaufärbung jener Zellen, die das bakterielle lacZ Gen transkribieren beziehungsweise das hierdurch kodierte Enzym Beta-Galaktosidase produzieren. Ein sehr hohes Expressionsniveau wurde in diesen Studien in Neuronen während der Embryonalperiode nachgewiesen. Mit zunehmender Neuronenreifung nahm die Expression des Reportergens lacZ ab, konnte jedoch postläsional erneut induziert werden. In zeitlicher Korrelation zu den hier präsentierten Studien konnte in adulten Motoneuronen des Nervus facialis fünf Tage nach dessen unilateraler Quetschung die Induktion der Ta1 $\alpha$ -Tubulinexpression nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, dass eine entsprechende Induktion sowohl in adulten Neuronen des peripheren als auch des zentralen Nervensystems stattfinden kann (Gloster et al. 1994). Weitere Studien zur endogenen Ta1 $\alpha$ -Tubulin mRNA Synthese bestätigten die entsprechende Dynamik der Expression des Ta1 $\alpha$ -Tubulins. Ta1 $\alpha$ -Tubulin ist ein Mitglied der  $\alpha$ -Tubulin Multigenfamilie und stellt hauptsächlich einen zytoskelettalen Bestandteil von wachsenden Neuriten dar (Daniels 1972). In neuronalen Populationen des zentralen Nervensystems findet sich ein hohes Transkriptionsniveau an Ta1 $\alpha$ -Tubulin mRNA während der embryonalen Entwicklung und während des Wachstums reifender Neurone (Miller et al. 1989). Als Zeichen der neuronalen Maturation wird die Synthese der Ta1 $\alpha$ -Tubulin mRNA herunterreguliert, sie kann als Wachstumsantwort auf extrinsische, läsionale Reize wieder aktiviert werden (Mathew und Miller 1993, Miller et al. 1989, Wu et al. 1993). Bamji und Miller konnten durch den Vergleich zwischen dem Muster der Transkription endogener Ta1 $\alpha$ -Tubulin mRNA und der Proteinexpression des Reportergens lacZ unter der Kontrolle des Ta1 $\alpha$ -Tubulinpromotors belegen, dass der Mechanismus der transgenen und endogenen Expression im adulten zentralen Nervensystem gleichwertig ist und, dass die höchsten Expressionsniveaus im adulten Gehirn in Regionen mit einer hohen Wachstumskapazität, zum Beispiel dem Hippocampus, dem visuellen und olfaktorischen System sowie dem cerebralen Cortex, erreicht werden (Bamji und Miller 1996). Für die Beurteilung und Interpretation der Untersuchungsergebnisse wird damit schlüssig belegt, dass das hier verwendete transgene Mausmodell Ta1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> beziehungsweise das System des Ta1 $\alpha$ -Tubulinpromotors im transgenen Mausmodell für die Untersuchung des Regenerations- und Wachstumsverhaltens reifer Neurone geeignet ist. Zusätzlich konnten diese Ergebnisse für die Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Ta1 $\alpha$ -Tubulinpromotor mit Hilfe der Transkriptionsanalyse

auf mRNA Ebene bestätigt und bezüglich der Distribution endogener und transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA weiter spezifiziert werden. Korrelierend zu den Untersuchungsergebnissen der Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression in der Immunhistochemie und im Western Blot erbrachte die mittels *in situ*-Hybridisierung durchgeführte Transkriptionsanalyse aus retinalem Gewebe der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mauslinie den Nachweis transgener und endogener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA in allen drei nukleären Schichten der Retina. Eine nukleäre wie auch zytoplasmatische Lokalisation der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA wurde auf eine Ko-Expression in Zellorganellen wie den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum nebst dem Zellkern zurückgeführt (Abbildung 16). Die eindeutige subzelluläre Lokalisation ist mit der konventionellen Mikroskopie allein nicht festzustellen. Sie bedarf der Darstellung durch andere, zum Beispiel ultrastrukturelle Methoden wie der Elektronenmikroskopie oder der Herstellung fraktionierter Proteinlysate. In der Literatur finden sich klare Hinweise auf eine zytoplasmatische Expression und Synthese von Bcl-X<sub>L</sub> in verschiedenen neuronalen und nichtneuronalen Zellpopulationen des adulten Säugetierorganismus, welche mit intrazellulären Organellen, dem Zellkern, den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum, in Verbindung gebracht wurden (Gonzalez-Garcia et al. 1995, Gonzalez-Garcia et al. 1994, Krajewski et al. 1994).

Insgesamt zeigte sich in der nativen Retina der transgenen Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse eine höhere Transkriptionsaktivität als in den Wildtyp-Kontrollen. Die selektive Detektion transgener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA mittels der KS/SV 40 p A1 Sonde in der nativen Retina zeigte positive Signale in der Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse. Eine zonale Gliederung für Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Synthese konnten auch andere Arbeitsgruppen beobachten (Levin et al. 1997). Zusätzlich zu der morphologischen Charakterisierung des nativen Transkriptionsmusters von Bcl-X<sub>L</sub> in der adulten Retina führten Levin und Kollegen Untersuchungen zu postläsionalen Veränderungen der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Synthese und Proteinexpression durch. Seine Beobachtungen stehen dabei im Einklang mit unseren Ergebnissen. So zeigte die Transkriptionsanalyse in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> und Wildtyp-Tiere mittels *in situ*-Hybridisierung, dass 14 Tage nach Sehnervenquetschung die endogene und transgene Bcl-X<sub>L</sub> mRNA in retinalen Ganglienzellen abnimmt. Hierzu liegen insbesondere zwei Erklärungsansätze nahe: Einerseits könnte diese Beobachtung als Folge des apoptotischen Zellunterganges und der konsekutiv reduzierten Anzahl an Bcl-X<sub>L</sub> transkribierenden retinalen Ganglienzellen interpretiert werden. Isenmann et al. konnten zeigen, dass die endogene Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression aufgrund der retrograden Degeneration retinaler Ganglienzellen bereits vier Tage nach der Sehnervenquetschung abnimmt (Isenmann et al. 1997). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Abnahme der Bcl-X<sub>L</sub>

Proteinexpression in Neuronen als Folge des apoptotischen Zellunterganges nach Ischämie zeigen (Krajewski et al. 1995). Andererseits könnte die postläsionale Abnahme der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Transkription in der retinalen Ganglienzellschicht auch als zellintrinsische Antwort auf den Läsionsreiz gedeutet werden. Für diesen Interpretationsansatz spricht die Tatsache, dass eine Abnahme der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Synthese und Proteinexpression in adulten retinalen Ganglienzellen bereits 24 Stunden nach Axotomie des Nervus opticus detektiert werden konnte und bis zum vierten Tag nach der Läsion um 30 % absinkt (Levin et al. 1997). Da die Änderung der Bcl-X<sub>L</sub> Expression auf der Ebene der mRNA und des Proteins zu einem Zeitpunkt beginnt, an dem die retrograde Degeneration retinaler Ganglienzellen minimal ist (Isenmann et al. 2003, Villegas-Perez et al. 1993), scheint eine einfach apoptotisch bedingte postläsionale Abnahme von Bcl-X<sub>L</sub> eher unwahrscheinlich und weitere endogene Reaktionsprozesse an der Bcl-X<sub>L</sub> Reklation beteiligt zu sein.

Transgene Bcl-X<sub>L</sub> mRNA konnte in unseren Studien unabhängig von der Regulation endogener Bcl-X<sub>L</sub> mRNA induziert werden und resultierte in einer vierfach erhöhten Anzahl signalpositiver retinaler Ganglienzellen (Abbildung 17). Diese Beobachtung korreliert und bestätigt zusätzlich die Ergebnisse der Immunhistochemie und des Western Blots und ist durch die postläsionale Induktion des  $\alpha$ -Tubulinpromotors bedingt. Diese postläsionale Induktion scheint mit entscheidend für das im Nachfolgenden (Kapitel 6.2) diskutierte, differente Regenerationsverhalten in den beiden transgenen Linien zu sein.

#### Postläsionale Kinetik der Bcl-X<sub>L</sub> Expression der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Maus:

Die transgene Überexpression von mBcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen unter dem Thy1-Promotor war dagegen nicht induzierbar und unterlag postläsional den bereits erwähnten apoptotischen Veränderungen. Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen in der Immunhistochemie und im Western Blot zeigten, dass die Zahl der Bcl-X<sub>L</sub> markierten und damit Bcl-X<sub>L</sub> exprimierenden retinalen Ganglienzellen in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen ab dem fünften Tag mit dem Einsetzen der Apoptose im postläsionalen Verlauf abnahm (Abbildung 18 und 19).

Thy1 ist ein spezifischer neuronaler Promotor des zentralen und peripheren Nervensystems, der in der Retina sowie in den Axonen und Zellkörpern der retinalen Ganglienzellen und in der inneren plexiformen Schicht exprimiert wird (Perry et al. 1984). In Nagetieren beginnt die Thy1 Expression in der postnatalen Entwicklung zwischen dem sechsten und zwölften Tag und hält ein konstantes Expressionsniveau bis zur und während der neuronalen Ausreifung aufrecht (Aigner et al. 1995, Caroni und Schwab 1988b). Die Axotomie des Nervus opticus führt zu einem über 95 %igen Verlust von Thy1 exprimierenden Neuronen in der Retina

(Perry et al. 1984). Die Beobachtungen früherer Studien anderer Arbeitsgruppen korrelieren somit mit dem in dieser Arbeit beschriebenen postläsionalen Verlust an Thy1-abhängiger Bcl-X<sub>L</sub> Synthese.

Insgesamt ist festzustellen, dass Bcl-X<sub>L</sub> ein charakteristisches und zeitlich reguliertes Expressionsmuster in der Retina besitzt. Durchgehend dominierend ist die Bcl-X<sub>L</sub> Synthese in retinalen Ganglienzellen, deren Identifikation innerhalb der retinalen Ganglienzellschicht durch die spezifische neuronale Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression infolge eines neuronalen Promotors gelang. Beide transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mausstämme zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nativ und postläsional ein erhöhtes Expressionsniveau in der Ganglienzellschicht. Basierend auf den differenten Eigenschaften der Promotor- und Transgenkassette ergaben sich Unterschiede in ihrer postläsionalen Dynamik der Proteinexpression. Diese Unterschiede im Transgenmodell bei identischen Läsions- und Umgebungsbedingungen sollten im Weiteren dazu beitragen, das Bcl-X<sub>L</sub> abhängige Überlebens- und Regenerationsverhalten subtiler zu erfassen. Dabei wird bereits an dieser Stelle deutlich, dass die Wahl des Promotors in transgenen oder *knock out* Tieren nicht nur das Zielgewebe der genetischen Modifikation, sondern auch das Level der Genexpression determiniert und damit die Effizienz der Genmutation beeinflussen kann.

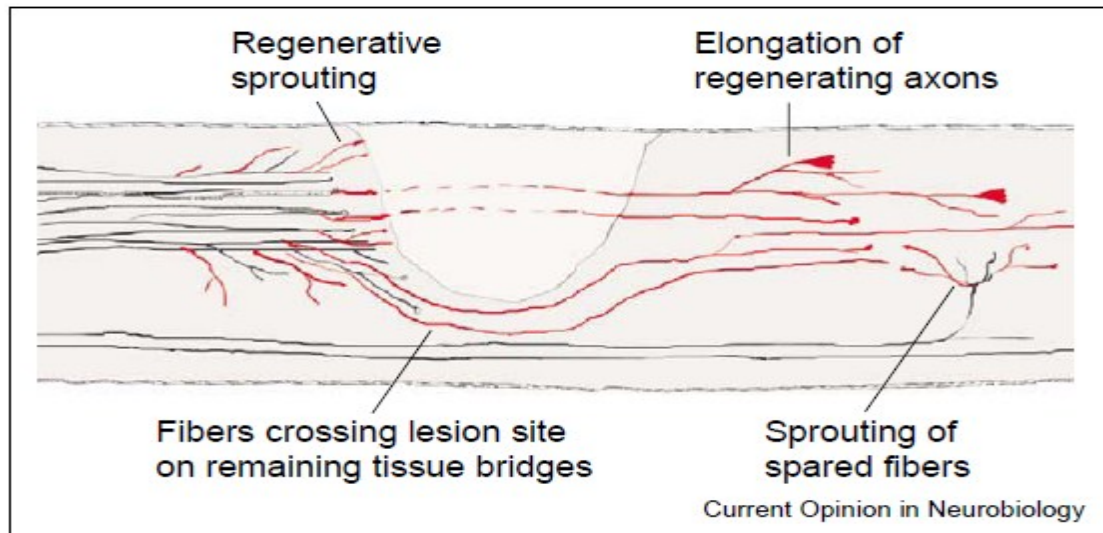
## 6.2. Regenerationsfördernde Effekte von Bcl-X<sub>L</sub>

Die Wachstumsanalysen *in vitro* und *in vivo* demonstrierten die regenerative Potenz von Bcl-X<sub>L</sub> in beiden transgenen Mauslinien. *In vitro* stimulierte die transgene Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen nach Sehnervenquetschung das axonale Wachstum in Bezug auf die Gesamtlänge und die Anzahl der neugebildeten Neuriten pro retinalem Basisabschnitt. Die proregenerative Potenz von Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo* konnte eindrücklich durch neu formierte GAP-43 positive Nervenfasern, die 14 Tage nach Sehnervenquetschung vom proximalen Nervenanteil in die Läsionsstelle hinein beziehungsweise über diese hinweg in den distalen Nervenstumpf des Nervus opticus einwuchsen, gezeigt werden.

Der Mechanismus der axonalen Wachstumsinhibition im zentralen Nervensystem ist nicht abschließend aufgeklärt. Prinzipiell kann Restauration im zentralen Nervensystem in Form einer *de novo* Synthese von Axonen an den überlebenden Somata erfolgen, was aktiver Regeneration entspricht. Davon abzugrenzen ist der Mechanismus des regenerativen Sproutings durch Ausbildung von distalen, läsionsnahen Verzweigungen an verbliebenen



Axonstümpfen (Abbildung 20). Ein kompensatorisches Sprouting findet zum Beispiel nach Hemitransektion des Rückenmarkes statt und beinhaltet das Aussprossen intakter Axone in die Läsionsregion. Diese letztgenannte Form der Regeneration ist für das Modell der Sehnervenquetschung am Nervus opticus irrelevant. Insgesamt sind „echte“ Regeneration und Sprouting in ihrer Fähigkeit, funktionell restaurativ zu wirken, als gleichwertig aufzufassen.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Regenerationsmechanismen im zentralen Nervensystem (Schwab 2004).**

Die Regeneration im zentralen Nervensystem kann in Form von „echter“ Regeneration durch axonales Wachstum an den überlebenden Neuronsomata oder in Form von kollateralem Sprouting durch Ausbildung von distalen läSIONsnahen Verzweigungen stattfinden.

Zahlreiche tierexperimentelle Studien befassen sich mit Neuroprotektion, Regeneration und funktioneller Wiederherstellung nach akuter Schädigung des zentralen Nervensystems (Fischer et al. 2001, Fischer et al. 2000, Isenmann et al. 2003, Isenmann et al. 1997, Kretz et al. 2004a). Die Quantifizierung regenerierender Fasern in Gewebekultursystemen oder *in vivo* stellt allerdings ein erhebliches methodisches Problem dar. Generell wird die Gesamtzahl der markierten Fasern von der Zahl der vorhandenen beziehungsweise überlebenden Projektionsneurone bestimmt. Bei der Quantifizierung von auswachsenden Fasern ist problematisch, dass bei einer großen Anzahl an Fasern die einzelnen Fasern nicht mehr gezählt werden können, da sie sich im Schnitt überlagern. Das trifft insbesondere auf Regeneratfasern zu, da sie nicht mehr den anatomisch streng geordneten, gebündelten Verlauf innerhalb der Nervenfaszikel einnehmen, sondern sich geschlängelt und gewunden in verschiedene Richtungen ausdehnen. In Zellkultur wurde häufig nach einer frühen Phase orthograden Wachstums sogar ein arkadenartiges „Rückwärtswachsen“ auf den retinalen Basistreifen hin beobachtet. Dies ist mit dem Fehlen von Lenkungsmolekülen wie Ephrinen,

Semaphorinen, Slits und Netrinen im artifiziellen *ex vivo* Milieu sowie im maturen zentralen Nervensystem in Zusammenhang zu bringen. Zielsuchende Axone treffen die wegbereitenden Entscheidungen mit Hilfe zahlreicher Lenkungsmoleküle, die auf den Wachstumskegel anziehenden (attraktiv) oder abstoßenden (repulsiv) Einfluss nehmen. Netrine, Slit und einige Semaphorine gehören zur Gruppe diffusionsfähiger Liganden, die sich mit Zellen beziehungsweise deren extrazellulärer Matrix verbinden. Ephrine und weitere Semaphorine lassen sich membranständigen Oberflächenmolekülen zuordnen (Dickson 2002, Tessier-Lavigne und Goodman 1996). Lenkungsmoleküle können gezielt in den Auf- und Abbau zytoskelettaler Bestandteile eingreifen, und so als attraktive Lenkungsmoleküle (Netrine) die Polymerisation der Axonzylinder und damit die axonale Wachstumsrichtung steuern. Andererseits können repulsive Lenkungsmoleküle (Ephrine) einen lokalen Zusammenbruch oder eine Depolymerisation zytoskelettaler Moleküle induzieren, die dann eine Richtungsänderung bewirkt (Dickson 2002). Darüber hinaus konnten wir *in vivo* eine Abkehr der neuformierten Axone von den zentralen, wachstumsrepulsiven Narbenregionen beobachten, so dass das Maximum der Faserelongation in den Randbereichen des Nervus opticus stattfand (Abbildung 11, 13 und 14). Aufgrund des multidirektionalen, ungeordneten Wachstums der Regeneratfasern war es nicht möglich, eine Einzelfaseranalyse zur Quantifizierung durchzuführen.

In der Literatur werden verschiedene Ansätze zur Quantifizierung auswachsender Fasern *in vitro* und *in vivo* erwähnt. Obata und Tanaka entwickelten ein Verfahren, mit dem sie einzelne Axone oder Bündel von Fasern am Rande eines Explantats in einem Abstand von 300 Mikrometer erfassten (Obata und Tanaka 1980). Sie ermittelten die Anzahl der Fasern semiquantitativ, indem sie das Faserwachstum der Explantate in Klassen einteilten. Wenn keine Fasern vorhanden waren, wurde das Explantat der Klasse null zugeteilt. Eine Anzahl von ein bis zehn Fasern entsprach der Klasse I, und mehr als zehn Fasern der Klasse II. Bei diesem Verfahren spielen die oben angeführten Probleme keine bedeutende Rolle mehr, da die Auswertung so grob ist, dass ohnehin nur starke Unterschiede gemessen werden. In anderen Ansätzen wurde auf eine Zählung der Fasern verzichtet und dafür die Fläche gemessen, die durch die ausgewachsenen Fasern bedeckt wurde (Dribin und Barrett 1982). Bei diesem Verfahren werden jedoch nur vergleichbare Werte ermittelt, wenn die Dichte der ausgewachsenen Faserbündel beziehungsweise Netzwerke konstant ist.

Wir haben in unseren Untersuchungen deshalb einen anderen Weg gewählt, um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen. *In vitro* haben wir eine quantitative Analyse der Regeneration in Bezug auf die Länge und die Anzahl neu gebildeter Neuriten pro retinalen

Basisabschnitt gewählt. Dabei wurde jeder individuelle Neurit mittels spezieller Softwareprogramme entsprechend seiner originalen Wachstumsrichtung und Dimension bezüglich Länge, Verzweigungsgrad und der Formation des Wachstumskegels nachgebildet und mathematisch charakterisiert. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig, impliziert dafür ein hohes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit.

Das Regenerationsverhalten *in vivo* wurde deskriptiv unter Berücksichtigung von Tracingsignalen und anatomischen Gegebenheiten im transversalen und longitudinalen Schnitt des Nervus opticus analysiert. Für eine quantitative Beurteilung wurde die maximale postläsionale Fläche GAP-43 positiver Neuriten in Bezug zum Diameter des Nervus opticus in der longitudinalen Schnittebene erfasst.

Insgesamt ermöglichten unsere *in vitro* und *in vivo* Auswertungsverfahren eine sensitive Beurteilung der axonalen Regeneration. Anhand des gewählten Neurofilamentmarkers SMI-31 und dem wachstumsassoziierten Marker GAP-43 ist zudem von einer hohen Spezifität axonaler Regenerationsmuster und guter Differenzierung zwischen degenerierenden und regenerierenden Fasern durch ihre gleichzeitige Applikation in Kombination mit den anterograden Tracingverfahren auszugehen.

### **6.2.1. Proregeneratives Potential von Bcl-X<sub>L</sub> *in vitro***

Die transgene Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen stimulierte *in vitro* das axonale Wachstum (Abbildung 9 und 10) in Bezug auf die Gesamtlänge und die Anzahl der neugebildeten Neuriten pro retinalem Basisabschnitt. Dabei unterschied sich die regenerative Potenz der beiden transgenen Mauslinien deutlich.

Das stärkste Regenerationspotential zeigte die Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mauslinie (Abbildung 9A). Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erreichte das Längenwachstum eine durchschnittlich 18fache Stimulation im Vergleich zum Kontrollwert der Wildtyp-Tiere sowie eine siebenfache Stimulation der Neuritenanzahl durch hBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Tα1α-Tubulinpromotor. Die Überexpression von mBcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen unter dem Thy1-Promotor stimulierte das axonale Wachstum durchschnittlich lediglich um das Dreifache in Bezug auf die Neuritenlänge und -anzahl im Vergleich zu den Ergebnissen in den Wildtyp-Tieren. Das verstärkte proregenerative Verhalten in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen gegenüber den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen kann durch die postläsionale Induktion von Bcl-X<sub>L</sub> unter dem Tα1α-Tubulinpromotor und der postläsionalen Reduktion von Bcl-X<sub>L</sub> in den Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen bedingt sein (Abbildung 17, 18 und 19). Offen blieb die Frage, ob in den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäusen infolge des höheren Bcl-X<sub>L</sub> Expressionsniveaus prolongiert auch eine verminderte Apoptoserate eintritt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> durch adenoviralen Gentransfer das axonale Wachstum *in vitro* stimuliert. Adenoviraler Gentransfer von Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo* und *in vitro* führte in Retinaexplantaten *in vitro* zu einer Steigerung der Neuritenanzahl um das 3,1fache beziehungsweise 5,22fache und der Neuritenlänge um das 6,72fache beziehungsweise 8,29fache (Kretz et al. 2004a). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Stimulation des axonalen Wachstums in Bezug auf die Neuritenanzahl, nicht jedoch auf die Neuritenlänge unter retroviraler Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression zeigen (Dietz et al. 2006). Beide Arbeitsgruppen nutzten ein ähnliches Tiermodell, doch die Dauer zwischen der Läsion des Nervus opticus und der Retinakultivierung, die der Phase der Wachstumsconditionierung entspricht, differierte deutlich mit zehn Tagen (Kretz et al. 2004a) versus drei Tagen (Dietz et al. 2006). Die unterschiedliche Versuchsdauer sowie Unterschiede in den für den Gentransfer gewählten viralen Vektoren könnten eine Erklärung für diese Beobachtungen sein.

Deutlich ist, dass im Vergleich zu den Voruntersuchungen unter Überexpression von hBcl-X<sub>L</sub> im Tiermodell sowie unter der Kontrolle des läsionsinduzierbaren Tα1α-Tubulinpromotors eine weitere, ausgeprägte Steigerung des axonalen Wachstums in retinalen Kulturen in Bezug auf die Stimulation der Neuritenanzahl und der Neuritenlänge erzielt werden konnte. Durch das transgene Mausmodell wird eine homogene und beständige Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in retinalen Ganglienzellen erreicht. Lediglich transiente und von der Konzentration des Vektors beziehungsweise der Transduktionseffizienz abhängige Bcl-X<sub>L</sub> Spiegel sowie transduktionsassoziierte Beeinträchtigungen durch lokal entzündliche Effekte sind *in vivo* ausgeschlossen und können essentiell zu der weiteren Stimulation der Regenerationseffekte beigetragen haben. Im Fall des *in vitro* Versuches entfallen zusätzlich durch das Immunsystem getriggerte inflammatorisch zytotoxische Reaktionen, die häufig durch die Fremdproteine des applizierten Vektors ausgelöst werden. Den hier angewandten Tiermodellen kommt somit eine wichtige bestätigende und erweiternde Aussagekraft bezüglich des Einflusses von Bcl-X<sub>L</sub> auf die Regeneration im maturen zentralen Nervensystem zu.

In der Gruppe der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse erwiesen sich die durchschnittlichen Werte für die Steigerung der Neuritenanzahl mit denen der Vorarbeiten als vergleichbar. Wenn auch die statistische Analyse im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Wildtyp-Tiere nicht signifikant ausfiel, so war dennoch eine Stimulation des axonalen Wachstums *in vitro* festzuhalten. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist im unterschiedlichen Konstrukt der transgenen Produkte und Promotoren begründet. Der Tα1α-Tubulinpromotors wird im Gegensatz zu dem

Thy1-Promotor postläsional ab dem fünften Tag induziert (Gloster et al. 1994). Thy1 als spezifischer neuronaler Promotor unterliegt in der Retina den Einflüssen der retrograden Zelldegeneration nach axonaler Schädigung zu einem hohen Anteil von bis zu 95 % (Perry et al. 1984). Zusätzlich scheint Thy1 als neuronales Oberflächenglykoprotein intrinsische Regenerationsfähigkeiten zu besitzen. In Entwicklungsstudien wies man in adulten retinalen Ganglienzellen Thy1 defizienter Mäuse signifikant weniger axonales Wachstum als in den Kontrolltieren nach (Simon et al. 1999). So ist entsprechend dieser Arbeit eine entscheidende Beteiligung von Thy1 an einer normalen retinalen Entwicklung anzunehmen, und sie lässt zudem eine Beteiligung an regenerativen Prozessen im postmitotischen Nervensystem möglich erscheinen.

### 6.2.2. Proregeneratives Potential von Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo*

Um das Regenerationsverhalten von Bcl-X<sub>L</sub> *in vivo* zu beurteilen, wurden 14 Tage nach der Sehnervenquetschung die optischen Nerven auf neu auswachsende Axone untersucht. Die Differenzierung zwischen *de novo* regenerierenden und die Läsion überlebenden Axonen wurde durch eine Doppelmarkierung mit dem Neurofilamentmarker SMI-31 und dem wachstumsassoziierten Marker GAP-43 versucht.

Es zeigte sich, dass die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> zu einer Stimulation des Nervenfaserwachstums im Nervus opticus *in vivo* führt (Abbildung 11). Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren beobachteten wir in den Longitudinalschnitten des Nervus opticus in 100 % (5/5) der optischen Nerven der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse und in 40 % (2/5) der optischen Nerven der Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse regenerierende GAP-43 positive Axone, die vom proximalen Nervenstumpf über die Läsionsstelle hinweg bis in den distalen Nervenanteil einwuchsen. Wachstumsassoziierte Prozesse in den Wildtyp-Tieren fanden sich ausschließlich und in reduziertem Ausmaß im proximalen Nervenanteil. Die regenerierenden Neurite waren aufgrund ihrer individuell verschiedenen Wachstumsrichtung in ihrer Dichte in der dreidimensionalen Nervenmatrix nicht eindeutig zu verfolgen und zu beurteilen. Um eine Quantifizierung der Regenerationsantwort und indirekt der Faserdichte zu ermöglichen, wurde die maximale Fläche GAP-43 positiver Axone in Bezug zum Diameter des Nervus opticus bestimmt. Die transgene Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression bewirkte eine signifikante Stimulation der Regenerationsantwort *in vivo* im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um das 2,4fache für die Gruppe der Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse sowie um das 1,8fache für die Thy1:mBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Mäuse.

Um die Beobachtungen aus den Longitudinalschnitten detaillierter zu erfassen und zusätzliche morphologische Charakteristika zu erkennen, wurden Querschnitte der optischen Nerven von

den Tieren mit dem höchsten Regenerationspotential, den  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen, untersucht. Hier zeigte sich erneut, dass unter  $Bcl-X_L$  Überexpression einige Axone die Läsionsstelle überbrücken und in den distalen Nervenanteil hinein regenerieren (Abbildung 13). Die Dichte auswachsender Fasern nahm dabei nach distal kontinuierlich ab. Im Vergleich der Diameter des optischen Nerven sowie nach SMI-31 Färbung (Abbildung 13H, 13K, 13N) wurde zusätzlich eine verzögerte Atrophie der neuronalen Faszikel in den  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen deutlich. Diese Phänomene waren in den Wildtyp-Tieren nicht erkennbar (Abbildung 14). GAP-43 positive Axone waren ausschließlich und im Vergleich zu den  $T\alpha1:hBcl-X_L^{+/-}$  Mäusen in deutlich geringerer Anzahl im proximalen Nervenanteil sichtbar (Abbildung 14A-14F). Zusätzlich erschienen die Nervenfasern der Wildtyp-Tiere verdünnt, dystroph und imponierten distal nahezu komplett degeneriert. Die wachstumsstimulierenden Eigenschaften von  $Bcl-X_L$  scheinen daher mit relevanten trophischen Effekten verbunden zu sein.

Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen legen nahe, dass  $Bcl-X_L$  ein hohes Potential zur Stimulation zellintrinsischer Regeneration besitzt. Allerdings scheint die Stimulation von  $Bcl-X_L$  allein nur teilweise in der Lage zu sein, die repulsiven und wachstumshemmenden Faktoren der Läsionsstelle zu neutralisieren und Regeneration über lange Distanzen zu ermöglichen. Mögliche Erklärungsansätze dieser Beobachtungen könnten sein:

#### Fehlende Fähigkeiten der Neutralisation extrinsischer inhibierender Effekte:

Die Glianarbe wird häufig als wichtigste Barriere axonalen Wachstums im zentralen Nervensystem angenommen (Asher et al. 2001, Fitch und Silver 1997, Moon und Fawcett 2001). Als essentielle, von Oligodendrozyten gebildete inhibitorische Komponenten werden außerdem das Myelin und Myelin-assoziierte Moleküle wie MAG (Myelin assoziierte Glykoprotein), Nogo und MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) aufgeführt (Hunt et al. 2002). Alle drei Proteine binden an den sogenannten Nogo-Rezeptor (NgR). Die Identifizierung von Nogo-A als prominenten Träger der inhibitorischen Aktivität des adulten zentralnervösen Myelins ermöglichte neue Strategien zu dessen funktioneller Neutralisation. Der monoklonale Antikörper IN-1 konnte durch Immunisierung von Mäusen mit angereichertem, inhibitorisch aktivem Myelinprotein der Ratte isoliert werden (Caroni und Schwab 1988a, Savio und Schwab 1989, Schwab 2004). Er neutralisiert die nonpermissive Eigenschaft von Myelin und ermöglicht zumindest teilweise das Aussprossen von postmitotischen Neuronen *in vitro*. Die Applikation des Antikörpers IN-1 in Ratten mit partiell durchtrenntem Rückenmark führte zu einer Regeneration der verletzten Neurone unter Umwachsen der Läsion, wobei der Regenerationserfolg in diesem Modell vergleichsweise

gering ausfiel (Schnell und Schwab 1990). Allerdings bewirkte die *in vivo* Applikation von IN-1 an gelähmten Ratten neben der anatomischen Regeneration auch eine Wiederherstellung der zuvor geschädigten motorischen Funktionen, wie spezifischer Reflexe und lokomotorischer Funktionen (Bregman et al. 1995). Dabei wuchsen die regenerierenden Axone in Gegenwart des Myelins über mehrere Millimeter hinweg und bildeten Verästelungen (Arborisierung) sowie terminale Verdickungen, die als präsynaptische Strukturen interpretiert wurden.

In den letzten Jahren sind mit Semaphorin 4D und Ephrin B3 weitere extrinsische Faktoren identifiziert worden, die das axonale Auswachsen von Neuronen des zentralen Nervensystems durch eine Destabilisierung des Wachstumskegels inhibieren können (Benson et al. 2005, De Winter et al. 2002, Miranda et al. 1999, Moreau-Fauvarque et al. 2003, Yiu und He 2006). Weiterhin können auch reaktive Astrozyten in der Gliaarbe eine Reihe putativ wachstumsinhibitorischer Moleküle exprimieren, wie zum Beispiel Chondroitinsulfatproteoglykane (Fitch und Silver 1997). Interessanterweise konnte durch intrathekale Applikation von Chondroitinase die intraläsionale beziehungsweise läsionsüberbrückende Regeneration sensorischer und motorischer Fasern und sogar die funktionelle Erholung im Rahmen des Abbaus von CSPG Molekülen nachgewiesen werden (Bradbury et al. 2002, Galtrey und Fawcett 2007). Andererseits wurde in atraumatischen Läsionsmodellen, die keine fibröse beziehungsweise gliöse Narbenbildung verursachen, beobachtet, dass adulte Axone in der Umgebung von weißer Gehirnssubstanz durchaus regenerieren können. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die inhibitorischen glialen Proteine ihre auf die axonale Regeneration hemmende Wirkung nur dann entfalten, wenn Oligodendrozyten verletzt werden, was durch minimalinvasive Eingriffe offensichtlich vermieden wird (Davies et al. 1997).

Diese Beispiele zeigen, dass die Narbe im Läsionsbereich eine nicht zu unterschätzende inhibitorische Struktur für regenerierende Axone darstellt und, dass für ein erfolgreiches Nervenfaserwachstum eine Kombination intrinsischer stimulierender Faktoren, wie Bcl-X<sub>L</sub>, mit einer Inhibition repulsiver extrinsischer Faktoren notwendig erscheint.

#### Notwendigkeit wachstumsfördernder Kofaktoren, den Neurotrophinen:

Neurotrophe Faktoren als Signalmoleküle, die das Überleben und die Regeneration von Nervenzellen regulieren, haben in zahlreichen Studien bewiesen, dass sie Regenerationsprozesse induzieren können (Cui 2006, Hu et al. 2007, Oshitari et al. 2010). Dabei sind vor allem die trk-Rezeptoren für die Vermittlung der Neurotrophineffekte verantwortlich. Zusätzlich erleichtert p75-NTR die Bindung der spezifischen Liganden an die

trk-Rezeptoren und kann die intrazelluläre Signaltransduktion unabhängig von Tyrosinkinasen initiieren (Chao 1994, Chao und Hempstead 1995). So konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der NGF-Bindung an p75-NTR die hochaffine Bindung von NGF an trkA reduziert (Weskamp und Reichardt 1991). Nach Hirnverletzungen wird die Expression der Neurotrophine als auch ihrer hochaffinen Rezeptoren in den betroffenen Gebieten hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass nach künstlich induzierten epileptischen Anfällen im Hippocampus der Ratte und nach zerebraler Ischämie trkB mRNA und trkB-Protein zeitgleich mit der Erhöhung von BDNF mRNA vermehrt vorkommen (Merlio et al. 1993).

Die beschriebenen Untersuchungen verdeutlichen, dass verschiedene Faktoren das Nervenfasernwachstum beeinflussen. Allerdings wird durch die pharmakologischen Eigenschaften der Neurotrophine mit ihrer kurzen Halbwertszeit, durch die Herunterregulation von Neurotrophinrezeptoren nach einer stattgehabten Läsion mit konsekutiv sinkender Responsivität geschädigter Neurone deutlich, dass ihre alleinige Anwendung nur transient und limitiert progenerative Effekte vermitteln kann (Goldberg und Barres 2000). Eine Kombination von Neurotrophinen mit intrinsischen oder extrinsischen Komponenten erscheint sinnvoll. Es konnte dabei gezeigt werden, dass isolierte retinale Ganglienzellen, die Bcl-2 überexprimieren, zwar längere Zeit in Kultur überleben, jedoch erst in Anwesenheit von Neurotrophinen oder durch elektrische Aktivität regeneratives Potential ausbilden (Goldberg et al. 2002). Deswegen wundert es nicht, dass die Regenerationsrate von retinalen Ganglienzellen in ein Ischiadicustransplantat bei Bcl-2 überexprimierenden Mäusen gegenüber dem Wildtyp kaum verändert war (Inoue et al. 2002). In der Literatur ist vielfach belegt, dass Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie Zielgene der durch Neurotrophine aktivierten Signalkaskaden darstellen (Deckwerth et al. 1996, Frankowski et al. 1995, Putcha et al. 2002). Unter ihnen scheint vor allem BDNF und sein Rezeptor trkB eine prominente Funktion für das Überleben und die Weiterentwicklung von retinalen Ganglienzellen zu besitzen. Über die durch trkB Rezeptorbindung aktivierte AKT- und MAPK- Signalkaskade wird CREB (cyclic AMP response element binding protein) phosphoryliert und die Transkription von Bcl-X<sub>L</sub> in der Retina induziert (Parrilla-Reverter et al. 2009, Peinado-Ramon et al. 1996). Zusätzlich konnte durch die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> dessen neuroprotektive Wirkung in sympathischen Neuronen nach dem Entzug des Neurotrophins NGF eindrücklich unter Beweis gestellt werden (Frankowski et al. 1995). Einen weiteren interessanten Aspekt stellt der vermutete Zusammenhang zwischen der neuroprotektiven Wirksamkeit von Estrogen und der darunter auftretenden erhöhten Expression von Bcl-X<sub>L</sub> dar (Pike 1999). Estrogen führt zu



einer raschen Aktivierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptorweges (IGF-1) und der damit verbundenen Signalkaskade (Kahlert et al. 2000). IGF-1 stellt einen wichtigen Faktor für das Überleben und die Regeneration von adulten Neuronen dar (Homma et al. 2007, Koriyama et al. 2007). Auch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt für die Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben eine bedeutende Rolle. Zu den durch NF- $\kappa$ B regulierten antiapoptotischen Genen zählt Bcl-X<sub>L</sub> (Mora et al. 2003). An dieser Stelle soll allerdings erneut erwähnt werden, dass das Überleben eines Neurons zwar notwendig, aber nicht unbedingt hinreichend für dessen axonale Regeneration sein muss. Die zugrundeliegenden Mechanismen und die Einbettung der regenerationsfördernden Eigenschaften von Bcl-X<sub>L</sub> in antiapoptotische und/oder proregenerative Signaltransduktionskaskaden bedürfen der weiteren Forschung.

#### Einflüsse durch das Läsionsmodell und den Faktor Zeit:

Häufig unterscheidet sich die regenerative Antwort in verschiedenen Läsionsmodellen wie zum Beispiel der Axotomie, der Sehnervenquetschung des Nervus opticus, der Rückenmarksdurchtrennung in Form der Hemitransektion, der ischämischen Läsion oder der toxischen Exzitation. Beeindruckende Regenerationsergebnisse konnten erzielt werden im Fall der kataraktogenen Linsenverletzung. Die Auslösung einer traumatischen Katarakt übt auf axotomierte retinale Ganglienzellen eine starke neuroprotektive und neuritogene Wirkung durch die Freisetzung intralentaler Faktoren oder durch eine intraokuläre Leukozyteninfiltration aus (Fischer et al. 2000, Leon et al. 2000). Leon et al. postulierten in diesem Zusammenhang, dass die neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte der kataraktogenen Linsenverletzung auf einer Aktivierung von Makrophagen beruht, die den Glaskörper und die Retina infiltrieren (Leon et al. 2000). Obwohl die intravitreale Injektion von aktivierten primären Makrophagen weder die axonale Regeneration noch die Expression des wachstumsassoziierten Proteins GAP-43 in retinalen Ganglienzellen induziert (Leon et al. 2000), wurde postuliert, dass das Makrophagen-sezernierte Protein Oncomodulin der Hauptmediator der läsionsinduzierten Effekte beziehungsweise der Inflammation sein soll (Yin et al. 2006). Diese Behauptung stützt sich auf die Beobachtung, dass Oncomodulin in Abhängigkeit einer gleichzeitigen Administration von cAMP die Regenerationsprozesse sowohl *in vitro* im Modell dissoziierter retinaler Ganglienzellen als auch in axotomierten retinalen Ganglienzellen *in vivo* induziert (Yin et al. 2006). Anzumerken ist bei dieser Studie jedoch, dass Oncomodulin nicht allein für diese positiven Effekte verantwortlich sein kann. Denn die neuritogenen Effekte *in vitro* und *in vivo* sind abhängig von Faktoren, die die Konzentration von intrazellulärem cAMP erhöhen (Yin et al. 2006). In der hiesigen Studie

wurde streng darauf geachtet, im Rahmen der intraokularen Injektionen die Linse nicht zu verletzen und somit die Freisetzung zusätzlicher proregenerativer Faktoren zu vermeiden.

Ein weiterer interessanter und modulationsfähiger Ansatzpunkt stellt der Faktor Zeit dar. Im Rahmen von Langzeitversuchen konnte nach einem Zeitraum von 30 Tagen beziehungsweise fünf Wochen im Modell der kataraktogenen Linsenverletzung eine Faserregeneration beobachtet werden, die die ursprüngliche Projektion bis zu ehemaligen Zielgebieten rekapitulierte (Berry et al. 1999, Fischer et al. 2001). Die Anzahl der über diese Distanz regenerierten Axone war auf ein bis zwei Prozent der ursprünglichen Axone beschränkt, was funktionell jedoch irrelevant erscheint. In dem von uns gewählten Versuchsmodell haben wir den Einfluss von Bcl-X<sub>L</sub> auf das frühe Regenerationsverhalten untersucht, so dass im Weiteren geklärt werden muss, ob Bcl-X<sub>L</sub> auch in Langzeitstudien restaurativ wirksam sein kann oder, ob die Regenerationsantwort abortiv wird und die neu gebildeten Axone aufgrund der fehlenden synaptischen Verknüpfung wieder absterben, bevor sie ihr Zielgewebe erreicht haben. Zur Beurteilung der funktionellen Relevanz der Axoneogenese kann zum Beispiel das Modell des virtuellen Optometers zur Quantifizierung der visuellen Parameter Kontrastsensitivität und Sehschärfe am Tier dienen, das von der Arbeitsgruppe Prusky etabliert wurde und auch in der Arbeitsgruppe Anwendung findet (Prusky et al. 2008, Prusky et al. 2006, Prusky et al. 2004).

Ungeachtet der vielfältigen und komplexen Mechanismen und deren Wechselwirkungen belegen diese zitierten Beispiele und unsere Experimente *in vitro* und *in vivo*, dass eine Stimulation axonalen Wachstums im zentralen Nervensystem durchaus möglich ist, es jedoch geeigneter und wahrscheinlich auch kombinierter Stimuli bedarf, um die Neurone und das extrinsische Milieu für Regenerationsereignisse hinreichend und effektiv zu konditionieren.

### **6.3. Antiapoptotische Effekte von Bcl-X<sub>L</sub>**

Bekannt und vielfältig belegt ist, dass die Proteine der Bcl-2 Familie wichtige Regulatoren der Apoptose im zentralen Nervensystem darstellen (Merry und Korsmeyer 1997). Retinale Ganglienzellen unterliegen nach axonaler Schädigung durch retrograde Degeneration einem Verlust von 80 bis 90 %. Der massivste Zelltod tritt innerhalb der ersten zwei Wochen auf (Isenmann et al. 2003, Villegas-Perez et al. 1993). Einerseits ist das zelluläre Überleben die Voraussetzung für axonales Wachstum, andererseits können aber auch apoptoseregulierende Mechanismen auf vordergründig paradoxe Weise zellintrinsisch die Regeneration steigern.

Diese These begründete sich auf Beobachtungen, die zeigen, dass nicht jede Substanz, die sich als neuroprotektiv erwies, auch zu einer verbesserten Regeneration nach Axotomie führte. Zudem regenerierten Axone paradoxerweise umso besser, je höher die Apoptoserate der betroffenen Neuronenpopulation war (Herdegen et al. 1997). Es scheint also keineswegs Voraussetzung zu sein, dass eine proregenerative Substanz auch neuroprotektiv wirksam ist. Es ist bislang unklar, inwieweit sich proregenerative und antiapoptotische Kaskaden überlappen und über welche Schlüsselmoleküle die differente funktionelle Regulation dieser Prozesse erfolgt.

Die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von Bcl-X<sub>L</sub> durch die Quantifizierung fluorogoldpositiver retinaler Ganglienzellen 14 Tage nach der Läsion gelang aus methodischen Gründen nicht suffizient. In der Literatur wird der durch eine Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> mittels viralen Gentransfers vermittelte neuroprotektive Effekt kontrovers diskutiert. Dietz et al. beschreiben eine Stimulation der Regeneration durch Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> durch retroviralen Gentransfer ohne Auswirkungen auf das Überleben retinaler Ganglienzellen *in vitro* (Dietz et al. 2006). Kritisch beurteilt werden sollte dabei die limitierte Versuchsdauer von fünf Tagen, die zu kurz erscheint, um auch prolongierte antiapoptotische Effekte hinreichend zu detektieren. Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe zum Überleben von retinalen Ganglienzellen nach Bcl-X<sub>L</sub> Transduktion in einem *in vivo* Modell der Ratte zeigten eine signifikante, jedoch lediglich moderate Zellrettung 14 Tage nach der Läsion (Kretz et al. 2004a). Es finden sich weitere Arbeiten, die auf eine neuroprotektive Wirkung von Bcl-X<sub>L</sub> hinweisen (Cao et al. 2002, Kilic et al. 2002). Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen an den in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien dokumentieren zusätzlich antiapoptotische Eigenschaften von Bcl-X<sub>L</sub> in neonatalen (Parsadanian et al, 1998) und adulten (Wiessner et al, 1999) kortikalen Neuronen. Transgene mBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Thy1-Promoter verringerte die Läsionsgröße nach fokaler cerebraler Ischämie (Wiessner et al. 1999). In der postnatalen Entwicklungsperiode konnte die transgene Überexpression von hBcl-X<sub>L</sub> unter dem Ta1 $\alpha$ -Tubulinpromotor neonatale Motoneurone nach Axotomie des Nervus facialis sowie Neurone des Kortex und Hippocampus nach Hypoxie retten (Parsadanian et al. 1998).

Auch wenn der direkte Nachweis der neuroprotektiven Wirkung von Bcl-X<sub>L</sub> aktuell nicht gelungen ist, so lassen die geschilderten morphologischen und biochemischen Untersuchungen sowie die vielfältigen Literaturhinweise die antiapoptotische Eigenschaft von Bcl-X<sub>L</sub> im transgenen Mausmodell gültig erscheinen. Das gesteigerte Transkriptionssignal und das vermehrte Vorhandensein Bcl-X<sub>L</sub> positiver Zellen in der Ganglienzellschicht in der

*in situ*-Hybridisierung, die postläsionale Lokalisation der Bcl-X<sub>L</sub> Proteinexpression in der retinalen Ganglienzellschicht sowie die trophischen Effekte im Nervus opticus unter Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren legen eine antiapoptotisch trophische Wirkung auch in unserem Modell nahe.

## 6.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist den neuritogenen und axoneogenetischen Effekt von Bcl-X<sub>L</sub> auf läionierte retinale Ganglienzellen nach Läsion des Nervus opticus *in vitro* und *in vivo* nach. Darüber hinaus scheint das der Bcl-2-Familie zugehörige Protein antiapoptotische und trophische Funktionen nicht nur auf immature, sondern auch auf adulte Neurone des zentralen Nervensystems auszuüben. Seine neuronale Überexpression wurde in dieser Arbeit mittels zweier transgener Tiermodelle herbeigeführt. Dabei stellte sich das transgene *in vivo* Modell der Vektor-basierten Überexpression als überlegen dar.

Im Hinblick auf seine therapeutische Anwendbarkeit liefern Vektor-basierte Studien bereits aktuell Grundlagen für zukünftige, im humanen Organismus applizierbare Gentransferstrategien. Experimentell sind nun jene Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren, die der Bcl-X<sub>L</sub> Transkription im Zellkern vorausgehen und differentiell Antiapoptose versus axonales Wachstum vermitteln. Weiterführende Studien im Tiermodell werden zeigen, ob die durch Bcl-X<sub>L</sub> vermittelte Stimulation der axonalen Regeneration sich auch im Langzeitversuch fortsetzt, oder ob es sich dabei um einen abortiven Prozess handelt. Auch bedarf der dauerhafte Erhalt neu gebildeter Axone ihrer Integration in funktionelle Netzwerke, das heißt ein klinischer Benefit ist nur bei synaptischer Reinnervation deafferenzierter Regionen des zentralen Nervensystems zu erwarten. Dabei kann die funktionelle Bedeutung und indirekt die Reintegration in neuronale Faserprojektionen *de novo* gebildeter Axone über funktionelle Testungen, wie zum Beispiel der virtuellen Optometrie nach Sehbahnschädigung oder durch elektrophysiologische Untersuchungen, wie zum Beispiel der Ableitung visuell evozierter Potentiale oder des Elektroretinogrammes nach Läsion des Nervus opticus am Tier evaluiert werden.

Zur weiteren Stimulation der proregenerativen Antwort in anatomisch korrekter Ausrichtung und mit potentiell funktioneller Relevanz kommt eine Kombination mit neuroprotektiven Strategien in Frage, wie zum Beispiel der koinzidenten Applikation von Neurotrophen. Die Neutralisation Myelin-assoziierten Wachstumsinhibitoren und deren Signalkaskaden, beispielsweise durch intrathekale Pumpentherapie mit IN-1-Antikörpern oder ROCK affiner

RNAi könnte sich durch komplementäre Wirkmechanismen additiv zum Bcl-X<sub>L</sub> Transfer auf die Axoneogenese auswirken. Die aktuellen Ergebnisse motivieren zu weiterführenden experimentellen Studien und eröffnen den Ausblick darauf, dass zukünftig klinisch praktikable und effektive Strategien zur Restauration von Läsionen des zentralen Nervensystems möglich sein könnten.

## 6.5. Zusammenfassung

Die initialen Fragestellungen lauteten und können wie folgt beantwortet werden:

- Zeigen die zwei transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien einen speziellen neuronalen Phänotyp in der Retina?

Unter transgener Bcl-X<sub>L</sub> Überexpression konnte in der nativen Retina kein spezifischer neuronaler Phänotyp identifiziert werden. Die Zytoarchitektur der Retina blieb unverändert.

- Welche Auswirkungen hat die transgene Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> in adulten Neuronen des zentralen Nervensystems auf das Regenerations- und Apoptoseverhalten von retinalen Ganglienzellen *in vitro* und *in vivo*?

Die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> im transgenen Tiermodell stimuliert axonales Wachstum postläsional überlebender adulter retinaler Ganglienzellen bezüglich der Länge und Anzahl regenerierter Neuriten *in vitro* beziehungsweise von Axonen *in vivo*. Bcl-X<sub>L</sub> vermittelte *in vivo* partiell sogar eine läsionsüberbrückende, axonale Regeneration im Nervus opticus.

Bcl-X<sub>L</sub> wirkt neuritogen und axoneogenetisch.

- Existieren Unterschiede im Regenerations- und Apoptoseverhalten der beiden transgenen Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien?

Die beiden Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierenden Mauslinien besitzen unterschiedliche Potenz zur Stimulation der axonalen Regeneration. Im Fall der hBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Tα1α-Tubulinpromotor wurden durch Bcl-X<sub>L</sub> signifikante Regenerationsprozesse *in vitro* und *in vivo* vermittelt. Im Fall der

mBcl-X<sub>L</sub> Überexpression unter dem Thy1-Promotor stimulierte Bcl-X<sub>L</sub> tendenziell die Regeneration *in vitro* und *in vivo*, jedoch eingeschränkt im Vergleich zu den Tα1:hBcl-X<sub>L</sub><sup>+/-</sup> Tieren.

- Kann transgenes Bcl-X<sub>L</sub> durch die Läsion induziert werden?

Die transgene Überexpression von hBcl-X<sub>L</sub> konnte unter dem neuronalen Tα1α-Tubulinpromotor postläsional in retinalen Ganglienzellen induziert werden. Die transgene Überexpression von mBcl-X<sub>L</sub> unter dem neuronalen Thy1-Promotor unterlag postläsional einer Apoptose-bedingten negativen Regulation durch die retrograde Degeneration retinaler Ganglienzellen. Die Divergenz der postläsionalen Expressionskinetik liegt in der Wahl der neuron-spezifischen Promotoren begründet.

- Welche zeitliche Dynamik bestimmt das Expressionsmuster von Bcl-X<sub>L</sub>?

Die postläsionale Proteinexpression war in ihrem zeitlichen Verlauf einerseits durch eine Reduktion von endogenem Bcl-X<sub>L</sub> infolge der retrograden Degeneration der retinalen Ganglienzellen gekennzeichnet, andererseits wird, bedingt durch das genomische Konstrukt, die Bcl-X<sub>L</sub> Expression unter dem Tα1α-Tubulinpromotor postläsional induziert.

Weiterhin ergaben sich Hinweise, dass Bcl-X<sub>L</sub> über andere Faktoren Wachstum und Regeneration positiv beeinflusst:

1. Es ergaben sich aus der hier vorliegenden Arbeit und der Literatur Hinweise, dass Bcl-X<sub>L</sub> auf läionierte adulte Neurone antiapoptotisch wirkt.
2. Neben antiapoptotischen Funktionen zeigte Bcl-X<sub>L</sub> trophische Auswirkungen mit reduzierter Atrophie und Wallerschen Degeneration läsionierter Nervenfaszikel.
3. Eventuell führt Bcl-X<sub>L</sub> zu einer Neutralisierung repulsiver Faktoren der postläsional gebildeten glialen und fibrösen Narbe.

## 7. Schlussfolgerung

Es gilt als etabliert, dass Neurone des zentralen Nervensystems nach einer Schädigung ihrer Axone der retrograden Degeneration unterliegen und die spontane Regenerationsantwort oder die Reinnervation ihrer Zielzellen nicht in einem funktionell relevanten Umfang stattfindet. Neuere Ansätze zur Stimulation einer extrinsischen und intrinsischen Regenerationsantwort durch verschiedene experimentelle Ansätze konnten entgegen dieser langjährigen Annahme teilweise vielversprechende Ergebnisse erzielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte deutlich gemacht werden, dass mature Neurone des zentralen Nervensystems nach einem Trauma durchaus eine limitierte Fähigkeit zur Regeneration besitzen, und dass eine geringe residuelle intrinsische Regenerationsbereitschaft durch die Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> reaktiviert werden kann. Im zentralen Nervensystem führt Bcl-X<sub>L</sub> also zu einer Art „Rejuvenilisierung“ von Neuronen. Diese Ergebnisse weisen Bcl-X<sub>L</sub> als einen vielversprechenden Kandidaten zur zukünftigen Entwicklung klinisch relevanter, therapeutischer Strategien zur Behandlung akuter und chronischer Läsionen des zentralen Nervensystems aus. Grundlage hierzu wird jedoch die Aufklärung der Bcl-X<sub>L</sub> vermittelten Wirkungsmechanismen sein sowie jener, die allgemein das axonale Wachstum stimulieren beziehungsweise den Verlust der Regenerationsfähigkeit unterbinden. Diese Arbeit sowie weitere Studien sollen dazu beitragen, künftig die koordinierte, zielgerichtete Regeneration adulter Nervenfasern in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems nach einer Verletzung erfolgreich zu ermöglichen.

So möchte ich schließen mit den Worten:

„It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree“ (Cajal, 1928).

## 8. Literaturverzeichnis

- Adams JM, Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 26 (1):61-66.
- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P. 1995. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell*, 83 (2):269-278.
- Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. 2001. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res*, 132:611-619.
- Bamji SX, Miller FD. 1996. Comparison of the expression of a T alpha 1:nlacZ transgene and T alpha 1 alpha-tubulin mRNA in the mature central nervous system. *J Comp Neurol*, 374 (1):52-69.
- Barbacid M. 1995. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 7 (2):148-155.
- Barinaga M. 2000. Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies. *Science*, 287 (5457):1421-1422.
- Barker PA. 2004. p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 42 (4):529-533.
- Benowitz LI, Routtenberg A. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, 20 (2):84-91.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Rodriguez W. 1990. GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. *Prog Brain Res*, 86:309-320.
- Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF. 2005. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (30):10694-10699.
- Berry M, Carlile J, Hunter A, Tsang W, Rosenstiel P, Sievers J. 1999. Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. *J Neurocytol*, 28 (9):721-741.
- Boise LH, Thompson CB. 1997. Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8):3759-3764.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74 (4):597-608.



- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416 (6881):636-640.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. 1997. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol*, 148 (2):475-494.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 378 (6556):498-501.
- Budd RC. 2001. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol*, 13 (3):356-362.
- Bunge RP. 1991. Schwann cells in central regeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 633:229-233.
- Buonomano DV, Merzenich MM. 1998. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci*, 21:149-186.
- Cao G, Pei W, Ge H, Liang Q, Luo Y, Sharp FR, Lu A, Ran R, Graham SH, Chen J. 2002. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci*, 22 (13):5423-5431.
- Caroni P, Schwab ME. 1988a. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1 (1):85-96.
- Caroni P, Schwab ME. 1988b. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol*, 106 (4):1281-1288.
- Cayal R. 1928. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Translated by R. M. May (London: University Press).
- Chao M, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chittka A, Kong H, Yoon SO. 1998. Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev*, 26 (2-3):295-301.
- Chao MV. 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol*, 25 (11):1373-1385.
- Chao MV, Hempstead BL. 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*, 18 (7):321-326.

- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403 (6768):434-439.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, 275 (5303):1122-1126.
- Cohen A, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J Neurobiol*, 25 (8):953-959.
- Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T, Borner C. 2000. Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO J*, 19 (7):1534-1544.
- Cui Q. 2006. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol Neurobiol*, 33 (2):155-179.
- Daniels MP. 1972. Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro. *J Cell Biol*, 53 (1):164-176.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91 (2):231-241.
- David S, Aguayo AJ. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science*, 214 (4523):931-933.
- Davies AM. 1993. Promoting motor neuron survival. *Curr Biol*, 3 (12):879-881.
- Davies AM. 1994. The role of neurotrophins during successive stages of sensory neuron development. *Prog Growth Factor Res*, 5 (3):263-289.
- Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. 1997. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, 390 (6661):680-683.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, Pasterkamp RJ, Gispens WH, Verhaagen J. 2002. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol*, 175 (1):61-75.
- Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Jr., Snider WD, Korsmeyer SJ. 1996. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*, 17 (3):401-411.
- Dickson BJ. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*, 298 (5600):1959-1964.
- Dietz GP, Dietz B, Bahr M. 2006. Bcl-x(L) increases axonal numbers but not axonal elongation from rat retinal explants. *Brain Res Bull*, 70 (2):117-123.

- Drager UC, Olsen JF. 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20 (3):285-293.
- Dribin LB, Barrett JN. 1982. Two components of conditioned medium increase neuritic outgrowth from rat spinal cord explants. *J Neurosci Res*, 8 (2-3):271-280.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68:383-424.
- Fang W, Rivard JJ, Mueller DL, Behrens TW. 1994. Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes. *J Immunol*, 153 (10):4388-4398.
- Fawcett JW, Asher RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49 (6):377-391.
- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S. 2000. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (12):3943-3954.
- Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. 2001. Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Exp Neurol*, 172 (2):257-272.
- Fitch MT, Silver J. 1997. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res*, 290 (2):379-384.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 409 (6818):341-346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. 2003. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 23 (4):1416-1423.
- Frankowski H, Missotten M, Fernandez PA, Martinou I, Michel P, Sadoul R, Martinou JC. 1995. Function and expression of the Bcl-x gene in the developing and adult nervous system. *Neuroreport*, 6 (14):1917-1921.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM. 2006. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med*, 12 (7):790-792.
- Freund P, Wannier T, Schmidlin E, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM. 2007. Anti-Nogo-A antibody treatment enhances sprouting of corticospinal axons rostral to a unilateral cervical spinal cord lesion in adult macaque monkey. *J Comp Neurol*, 502 (4):644-659.
- Galtrey CM, Fawcett JW. 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 54 (1):1-18.

- Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. 1992. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science*, 258 (5080):302-304.
- Gloster A, Wu W, Speelman A, Weiss S, Causing C, Pozniak C, Reynolds B, Chang E, Toma JG, Miller FD. 1994. The T alpha 1 alpha-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J Neurosci*, 14 (12):7319-7330.
- Goldberg JL, Barres BA. 2000. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23:579-612.
- Goldberg JL, Espinosa JS, Xu Y, Davidson N, Kovacs GT, Barres BA. 2002. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 33 (5):689-702.
- Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballesteros R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, Nunez G. 1994. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 120 (10):3033-3042.
- Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nunez G. 1995. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (10):4304-4308.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72 Suppl:77-98.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, 403 (6768):439-444.
- Greene LA, Kaplan DR. 1995. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 5 (5):579-587.
- Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D, Duan L, Inohara N, Ohta S, Seldin MF, Nunez G. 1997. Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*, 158 (10):4750-4757.
- Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC. 2003. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*, 423 (6938):456-461.
- Herdegen T, Skene P, Bahr M. 1997. The c-Jun transcription factor--bipotent mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci*, 20 (5):227-231.
- Homma K, Koriyama Y, Mawatari K, Higuchi Y, Kosaka J, Kato S. 2007. Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Neurochem Int*, 50 (5):741-748.

- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (8):4386-4391.
- Hu Y, Arulpragasam A, Plant GW, Hendriks WT, Cui Q, Harvey AR. 2007. The importance of transgene and cell type on the regeneration of adult retinal ganglion cell axons within reconstituted bridging grafts. *Exp Neurol*, 207 (2):314-328.
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci*, 22 (9):3553-3567.
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. 2002. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol*, 31 (2):93-120.
- Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y, Fukuda Y. 2002. Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J Neurosci*, 22 (11):4468-4477.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A. 2003. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res*, 22 (4):483-543.
- Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bahr M. 1997. Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci*, 9 (8):1763-1772.
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. 2000. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, 275 (24):18447-18453.
- Kalb R. 2005. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci*, 28 (1):5-11.
- Keirstead HS, Dyer JK, Sholomenko GN, McGraw J, Delaney KR, Steeves JD. 1995. Axonal regeneration and physiological activity following transection and immunological disruption of myelin within the hatchling chick spinal cord. *J Neurosci*, 15 (10):6963-6974.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.
- Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. 1997. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (13):6939-6942.

- Kilic E, Hermann DM, Kugler S, Kilic U, Holzmüller H, Schmeer C, Bahr M. 2002. Adenovirus-mediated Bcl-X(L) expression using a neuron-specific synapsin-1 promoter protects against disseminated neuronal injury and brain infarction following focal cerebral ischemia in mice. *Neurobiol Dis*, 11 (2):275-284.
- Klockner N, Braunling F, Isenmann S, Bahr M. 1997. In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. *Neuroreport*, 8 (16):3439-3442.
- Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, Higuchi Y, Matsukawa T, Murayama D, Kato S. 2007. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int*, 50 (5):749-756.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol*, 4 (6):327-332.
- Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, Song K, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC. 1996. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol*, 149 (5):1449-1457.
- Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. 1995. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*, 15 (10):6364-6376.
- Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC. 1994. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res*, 54 (21):5501-5507.
- Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407 (6805):789-795.
- Kretz A, Hermening SH, Isenmann S. 2004b. A novel primary culture technique for adult retina allows for evaluation of CNS axon regeneration in rodents. *J Neurosci Methods*, 136 (2):207-219.
- Kretz A, Kugler S, Happold C, Bahr M, Isenmann S. 2004a. Excess Bcl-XL increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons in vitro. *Mol Cell Neurosci*, 26 (1):63-74.
- Kretz A, Marticke JK, Happold CJ, Schmeer C, Isenmann S. 2007. A primary culture technique of adult retina for regeneration studies on adult CNS neurons. *Nat Protoc*, 2 (1):131-140.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. 2000. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci*, 20 (12):4615-4626.

- Levin LA, Schlamp CL, Spieldoch RL, Geszvain KM, Nickells RW. 1997. Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38 (12):2545-2553.
- Li D, Field PM, Raisman G. 1995. Failure of axon regeneration in postnatal rat entorhinohippocampal slice coculture is due to maturation of the axon, not that of the pathway or target. *Eur J Neurosci*, 7 (6):1164-1171.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94 (4):491-501.
- Li Y, Raisman G. 1994. Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 14 (7):4050-4063.
- Lindsay RM, Altar CA, Cedarbaum JM, Hyman C, Wiegand SJ. 1993. The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 124 (1):103-118.
- Loeffler M, Kroemer G. 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256 (1):19-26.
- Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M. 2006. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain*, 129 (Pt 2):490-502.
- Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD, Barker PA. 1997. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 17 (18):6988-6998.
- Martinou JC, Frankowski H, Missotten M, Martinou I, Potier L, Dubois-Dauphin M. 1994b. Bcl-2 and neuronal selection during development of the nervous system. *J Physiol Paris*, 88 (3):209-211.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, et al. 1994a. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13 (4):1017-1030.
- Mathew TC, Miller FD. 1993. Induction of T alpha 1 alpha-tubulin mRNA during neuronal regeneration is a function of the amount of axon lost. *Dev Biol*, 158 (2):467-474.
- Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjo BK, Hunter T, Lindvall O, et al. 1993. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron*, 10 (2):151-164.

- Merry DE, Korsmeyer SJ. 1997. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 20:245-267.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7 (3):221-228.
- Miller FD, Tetzlaff W, Bisby MA, Fawcett JW, Milner RJ. 1989. Rapid induction of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during nerve regeneration in adult rats. *J Neurosci*, 9 (4):1452-1463.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385 (6614):353-357.
- Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Jagid J, Whittemore SR. 1999. Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 156 (1):218-222.
- Moon LD, Fawcett JW. 2001. Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci*, 14 (10):1667-1677.
- Mora AL, Corn RA, Stanic AK, Goenka S, Aronica M, Stanley S, Ballard DW, Joyce S, Boothby M. 2003. Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL. *Cell Death Differ*, 10 (9):1032-1044.
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A. 2003. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci*, 23 (27):9229-9239.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, et al. 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 267 (5203):1506-1510.
- Motoyama S, Kitamura M, Saito S, Minamiya Y, Suzuki H, Saito R, Terada K, Ogawa J, Inaba H. 1998. Bcl-2 is located predominantly in the inner membrane and crista of mitochondria in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 249 (3):628-636.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381 (6580):335-341.



- Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC. 1993. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*, 268 (34):25265-25268.
- Obata K, Tanaka H. 1980. Conditioned medium promotes neurite growth from both central and peripheral neurons. *Neurosci Lett*, 16 (1):27-33.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 (4):609-619.
- Oppenheim RW, Yin QW, Prevette D, Yan Q. 1992. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*, 360 (6406):755-757.
- Oshitari T, Yoshida-Hata N, Yamamoto S. 2010. Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high glucose. *Brain Res*.
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, Garcia KC, He Z. 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*, 45 (3):345-351.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. 2009. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res*, 89 (1):32-41.
- Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holtzman DM, Snider WD. 1998. Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci*, 18 (3):1009-1019.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37 (4):489-500.
- Perry VH, Morris RJ, Raisman G. 1984. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *J Neurocytol*, 13 (5):809-824.
- Pike CJ. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 72 (4):1552-1563.
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27 (50):6407-6418.

- Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. 2000. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*, 403 (6768):383-384.
- Prusky GT, Alam NM, Douglas RM. 2006. Enhancement of vision by monocular deprivation in adult mice. *J Neurosci*, 26 (45):11554-11561.
- Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. 2004. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (12):4611-4616.
- Prusky GT, Silver BD, Tschetter WW, Alam NM, Douglas RM. 2008. Experience-dependent plasticity from eye opening enables lasting, visual cortex-dependent enhancement of motion vision. *J Neurosci*, 28 (39):9817-9827.
- Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson EM, Jr. 2002. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol*, 157 (3):441-453.
- Rautureau GJ, Day CL, Hinds MG. 2010. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int J Mol Sci*, 11 (4):1808-1824.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. 2002. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*, 192 (2):131-137.
- Reed JC. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387 (6635):773-776.
- Sabel BA, Sautter J, Stoehr T, Siliprandi R. 1995. A behavioral model of excitotoxicity: retinal degeneration, loss of vision, and subsequent recovery after intraocular NMDA administration in adult rats. *Exp Brain Res*, 106 (1):93-105.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275 (5302):983-986.
- Sautter J, Sabel BA. 1993. Recovery of brightness discrimination in adult rats despite progressive loss of retrogradely labelled retinal ganglion cells after controlled optic nerve crush. *Eur J Neurosci*, 5 (6):680-690.
- Savio T, Schwab ME. 1989. Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J Neurosci*, 9 (4):1126-1133.

- Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P, Bray GM, Aguayo AJ. 1996. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 16 (12):3887-3894.
- Scherer J, Schnitzer J. 1991. Intraorbital transection of the rabbit optic nerve: consequences for ganglion cells and neuroglia in the retina. *J Comp Neurol*, 312 (2):175-192.
- Schmeer C, Straten G, Kugler S, Gravel C, Bahr M, Isenmann S. 2002. Dose-dependent rescue of axotomized rat retinal ganglion cells by adenovirus-mediated expression of glial cell-line derived neurotrophic factor in vivo. *Eur J Neurosci*, 15 (4):637-643.
- Schnell L, Schwab ME. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*, 343 (6255):269-272.
- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*, 367 (6459):170-173.
- Schwab ME. 2004. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14 (1):118-124.
- Schwab ME. 2010. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 11 (12):799-811.
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, Murray B, Jung V, Pepinsky RB, Mi S. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*, 45 (3):353-359.
- Shewan D, Dwivedy A, Anderson R, Holt CE. 2002. Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nat Neurosci*, 5 (10):955-962.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*, 56 (9):2161-2166.
- Shinoura N, Satou R, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. 2000. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 254 (2):221-231.
- Simon PD, McConnell J, Zurakowski D, Vorwerk CK, Naskar R, Grosskreutz CL, Dreyer EB. 1999. Thy-1 is critical for normal retinal development. *Brain Res Dev Brain Res*, 117 (2):219-223.

- Skene JH. 1989. Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci*, 12:127-156.
- Srinivasula SM, Saleh A, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2001. Isolation and assay of caspases. *Methods Cell Biol*, 66:1-27.
- Stichel CC, Muller HW. 1994. Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J Neurocytol*, 23 (10):615-630.
- Stichel CC, Lips K, Wunderlich G, Muller HW. 1996. Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. *Exp Neurol*, 140 (1):21-36.
- Stoll G, Jander S, Myers RR. 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst*, 7 (1):13-27.
- Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC. 1992. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. *J Neurobiol*, 23 (5):507-520.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274 (5290):1123-1133.
- Thanos S, Mey J. 1995. Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J Neurosci*, 15 (2):1057-1079.
- Thanos S, Mey J. 2001. Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev*, 35 (3):205-245.
- Thornberry NA. 1999. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ*, 6 (11):1023-1027.
- Varga ZM, Schwab ME, Nicholls JG. 1995. Myelin-associated neurite growth-inhibitory proteins and suppression of regeneration of immature mammalian spinal cord in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24):10959-10963.
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75 (2):229-240.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol*, 24 (1):23-36.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. 2002b. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420 (6911):74-78.

- Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM. 2002a. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci*, 22 (13):5505-5515.
- Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y. 1991. Axonal regeneration of retinal ganglion cells in the cat geniculocortical pathway. *Brain Res*, 560 (1-2):330-333.
- Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y. 1994. Myelination of regenerated optic fibers in peripheral nerve graft of adult cats. *Exp Brain Res*, 98 (1):39-43.
- Weise J, Isenmann S, Klocker N, Kugler S, Hirsch S, Gravel C, Bahr M. 2000. Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo. *Neurobiol Dis*, 7 (3):212-223.
- Weskamp G, Reichardt LF. 1991. Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron*, 6 (4):649-663.
- Wiessner C, Allegrini PR, Rupalla K, Sauer D, Oltersdorf T, McGregor AL, Bischoff S, Bottiger BW, van der Putten H. 1999. Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett*, 268 (3):119-122.
- Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. 1996. Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci*, 16 (22):7193-7205.
- Wu W, Mathew TC, Miller FD. 1993. Evidence that the loss of homeostatic signals induces regeneration-associated alterations in neuronal gene expression. *Dev Biol*, 158 (2):456-466.
- Xu WD, Gu YD, Xu JG, Tan LJ. 2002. Full-length phrenic nerve transfer by means of video-assisted thoracic surgery in treating brachial plexus avulsion injury. *Plast Reconstr Surg*, 110 (1):104-109; discussion 110-101.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369 (6478):321-323.
- Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, Langer R, Benowitz LI. 2006. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci*, 9 (6):843-852.
- Yiu G, He Z. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 7 (8):617-627.

- Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J. 1996. Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human bcl-2 transgene. *J Comp Neurol*, 374 (3):332-341.
- Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J. 1997. Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell numbers in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J Neurobiol*, 32 (5):502-516.
- Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. 2003. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem*, 278 (24):22061-22070.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. 2008. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*, 130 (4):635-653.
- Zorner B, Schwab ME. 2010. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*, 1198 Suppl 1:E22-34.

## 9. Anhang

### Materialien

#### Puffer, Lösungen und Kulturmedien

##### Blockierungslösung (Western Blot)

4 g „Slim Fast“ in 100 ml TBS-T

##### Detektionspuffer

**pH 9,5:** 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

**pH 8,0:** 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan-HCl, 0,1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

##### Elektrophoresegele

Sammelgel: 0,65 ml 30 % Acrylamid, 1,25 ml 4xTris Cl/SDS, 3,05 ml Aqua dest.,

25 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 5 µl Temed®

Trenngel: 5 ml 30 % Acrylamid, 3,75 ml 4xTris Cl/SDS (1,5 M TrisCl + 0,4 % SDS),

6,25 ml Aqua dest., 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 10 µl Temed®

##### Hybridisierungspuffer

50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 10 mM Trishydroxymethylaminomethan-HCl,

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml t-RNA,

1 ' Denhardt's Lösung

##### Kultivierungsmedium (S-MEM); Präparationsmedium (FCS-freies S-MEM)

100 ml/l S-MEM, 3500 mg/l Glucose, 3700 mg/l NaHCO<sub>3</sub>, 3574 mg/l HEPES, 5 mg/l Insulin,

0,01 mg/l Choleratoxin, 8 mg/l Putrescin, 0,0043 mg/l Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 792 mg/l BSA (Albumin),

1,51 mg/l Linolsäure, 1 mg/l Linolensäure, 3,6 mg/l L-Alanin, 4 mg/l L-Asparagin,

4 mg/l L-Aspartat, 4,3 mg/l L-Glutamat, 8 mg/l L-Prolin, 0,024 mg/l Biotin,

0,12 mg/l Liponsäure, 1,35 mg/l Vitamin B<sub>12</sub>, 10 µg/l Spurenelemente,

10 ml Pen-Strep (1:100), 1 ml Fungizone (1:1000) in H<sub>2</sub>O und 10 % FCS

##### 6xSDS Ladepuffer

100 mM Tris-Cl, 6 % SDS, 40 % Glycerol, 6 % β-Mercaptoethanol,

0,1 % Bromphenolblau

##### LB-Medium

10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt in H<sub>2</sub>O

**Lysepuffer, pH 8,0**

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100

**10x MOPS Puffer, pH 7,0**

10x: 200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA

**Mowiol, pH 8-8,5**

25 g Mowiol in 100 ml PBS, 50 ml Glycerin

**PAGE-Puffer, pH 8,3**

1,51 % Tris-Base, 7,2 % Glycin, 5 % SDS, 86,29 % H<sub>2</sub>O

**PBS, pH 7,4**

8 g/l NaCl (138 mM), 0,2 g/l KCl (2,7 mM), 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47 mM),  
14,3 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,06 mM) in H<sub>2</sub>O

**PFA, 4 %**

800 ml Aqua dest., 40 g Paraformaldehyd, 200 ml 0,6 M PBS

**Probenpuffer 1**

6x: 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA

**Probenpuffer 2**

50 µl Formamid, 17,5 µl Formaldehyd, 5 µl 10xMOPS, 1 µl Ethidiumbromid,  
26,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

**SSC**

2 × SSC: 0,3 M NaCl, 30 mM Trinatriumcitrat × 2H<sub>2</sub>O

1 × SSC: 0,15 M NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat × 2H<sub>2</sub>O

0,2 × SSC: 30 mM NaCl, 3 mM Trinatriumcitrat × 2H<sub>2</sub>O

0,1 × SSC: 15 mM NaCl, 1,5 mM Trinatriumcitrat × 2H<sub>2</sub>O 0,2 × SSC

**TAE-Puffer**

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

**TBS, pH 7,5**

2,42 g/l Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (20 mM), 8 g/l NaCl (138 mM), 3,8 ml/l HCl (1 M) in H<sub>2</sub>O

**TBS-T**

2,42 g/l Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (20 mM), 8 g/l NaCl (138 mM), 3,8 ml/l HCl (1 M),  
0,1 % Tween-20 in H<sub>2</sub>O



**TE-Puffer**

10 mM Tris, 1 mM EDTA

**Transferpuffer**

0,3 % Tris-Base, 1,73 % Glycin, 20 % Methanol, 78,24 % H<sub>2</sub>O

**Chemikalien**

Acrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
Bradford Reagenz	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DAPI	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
1 ' Denhardt's	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DEPC	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dextransulfat	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNA-Längenstandard	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
ECL-plus® Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin G Lösung; 0,5 % wässrig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure-Anhydrid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fluorogold	Fluorochrome Inc., Denver, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Formamid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Glycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hämatoxylin modifiziert nach Gill III	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
LiBr <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
MOPS	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol	Calbiochem, La Jolla, USA
Na-Acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NBT/BCIP	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
NaCl	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumdodecylsulfat	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NGS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ofloxacin Augentropfen	Mann, Berlin, Deutschland
RNA-Längenstandard	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Succrose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Temed®	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek	Sakura Finetek, Alphen, Niederlande
Triethanolamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-Acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-Cl	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
1 mg/ml t-RNA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

**Chemikalien für Zellkultur und Medien sowie Zellkulturartikel**

Biotin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
BSA (Albumin)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fungizone	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Alanin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Aspartat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Laminin	BD, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Linolsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Linolensäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Liponsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Prolin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lysin, Poly-L	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nitrozellulosefilter (45 µm Porengröße)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pen-Strep	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Petri Perm <sup>®</sup> Kulturschalen (5 cm Durchmesser)	Viva Science, Hannover, Deutschland
Putrescin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Rundfilter	Schleicher&Schuell, Düren, Deutschland
S-MEM	Bio West, Nuaille, Frankreich
Spurenelemente	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vitamin B <sub>12</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vitamin C	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

**Enzyme und Kits**

Plasmid DNA Maxi-Prep	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DIG-RNA-Labeling Kit (Sp6/T7)	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz

DIG Chemiluminescent Detection Kit	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
T7/T3 RNA-Polymerase	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
EcoR1	New England Biolabs, Beverly, USA
XBa1	New England Biolabs, Beverly, USA
HIND3	New England Biolabs, Beverly, USA

### Antikörper

Anti-SMI- 31	Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA
Anti-Bcl-X <sub>L</sub> /S	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-GAP-43	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Anti-DIG	Zymed, Wien, Österreich
Alkalischer Phosphatase konjugierte	
Antikörper gegen DIG	Roche Diagnostic, Basel, Schweiz
Alexa Fluoro 488	
(Cholera Toxin Subunit B (CT-B) Conjugate)	Molecular Probes Inc., Oregon, USA
Anti-Alexa Fluoro 488	Molecular Probes Inc., Oregon, USA
HRP-konjugiertes <i>anti-rabbit</i> -IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Cy 3	Molecular Probes Inc., Oregon, USA

### Tiere

Tα1:hBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	Alexander Sh. Parsadanian (Centre for the Study of Nervous System Injury, Washington University School of Medicine, St.Louis, Missouri)
Thy1:mBcl-X <sub>L</sub> <sup>+/-</sup>	Bernd W. Böttger (Universitätsklinikum Heidelberg, Klinik für Anästhesiologie)
C57Bl/6 Mäuse	Zucht Charles River, Sulzfeld,
Deutschland	

### Zellen

Escherichia coli DH 5 alpha Zellen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
------------------------------------	------------------------------------

**Laborgeräte**

Brutschrank, aerob	Heraeus, Hanau, Deutschland
Computer Fujitsu computers	Siemens AG, Berlin, Deutschland
Digitalkamera AxioCam Hrc,	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Heizblock	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Kryostat	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mikroskop, binocular	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Rundklemme	FST, Heidelberg, Deutschland
Mikroschere	FST, Heidelberg, Deutschland
Operationsmikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
pH-Meter	WTW Inc., Gold River, USA
Rundklemme	FST, Heidelberg, Deutschland
Rührer	H+P Labortechnik, Oberschleissheim, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tissue Chopper	Mc Illwain
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

**Verbrauchsmaterialien**

Falcons (25ml; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier (Whatman-Papier)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gel foam	Pharmacia&Upjohn, Bridgewater, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Deutschland
Petrischalen (unbeschichtet)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Superfrost-Plus Objektträger	Fisher Scientific, Reinach, Schweiz

## Lebenslauf

Julia Karin Pester, geborene Marticke

Geburtsdatum: 8. Januar 1981

Geburtsort: Jena

### Schulbildung

1991 - 1999 Staatliches Gymnasium „Leuchtenburg“, Kahla

1999 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1999 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Oktober 2006 Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit dem Dritten Staatsexamen

Seit Dezember 2006 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Jena

Jena, den 28.10.2011

Julia Pester

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Otto W. Witte, Direktor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena, für sein Verständnis, seine Unterstützung und die Übernahme der fachlichen Betreuung dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Isenmann, der mein wissenschaftliches Interesse gefördert hat, für die Überlassung des spannenden Themas, seine tatkräftige Unterstützung und seinen Einsatz während der experimentellen Arbeit. Anregende Diskussionen und eine enge Zusammenarbeit haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Dr. med. Alexandra Kretz, die das Thema dieser Arbeit anregte und das fruchtbare Fortschreiten dieses Werkes mit großem Interesse und beeindruckenden Engagement verfolgte. Ohne Ihre hervorragende und umfassende Betreuung, Ihre fortwährende Unterstützung, Ihre Geduld, Freundschaft und stetige Motivation bei der experimentellen Umsetzung und schriftlichen Fertigstellung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zweifelsohne und vorbildhaft hat Frau Dr. med. Alexandra Kretz meinen persönlichen und wissenschaftlichen Werdegang geprägt.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden im Labor der experimentellen Neurologie für das positive Umfeld meiner Arbeit. Die Arbeit in dieser Arbeitsgruppe hat mir großen Spaß gemacht, ich habe viel gelernt und diese Zeit sehr genossen. Im Einzelnen bedanke ich mich insbesondere bei der „guten Fee“ des Labors Svetlana Tausch für Ihre hervorragende technische Assistenz, die freundschaftliche Zusammenarbeit und beste Stimmung während der Laborarbeit. Frau Dr. Christiane Frahm und Herrn Dr. rer. nat. Stefan Hermening danke ich für die Hilfe bei der methodischen Umsetzung der *in situ*-Hybridisierung und der Bearbeitung dieses Teilaspektes. Dr. rer. nat. Christian Schmeer danke ich für die konstruktive wissenschaftliche Diskussion und seine optimistische Gelassenheit.

Meinen Eltern, Karin und Alexander Marticke bin ich tief verbunden und dankbar für Ihre uneingeschränkte Unterstützung bei allen meinen Vorhaben, Ihren Glauben und Ihr Vertrauen in mich und dieses Projekt. Ihre liebevolle Betreuung meiner Kinder hat erst den nötigen zeitlichen Freiraum ermöglicht.

Meinem Ehemann Frank danke ich für seine geduldige Unterstützung in den schwierigen Phasen dieser Arbeit, in denen er mir ein wertvoller, anregender und motivierender Gesprächspartner war.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. O.W. Witte, Herr Prof. Dr. med. S. Isenmann und Frau Dr. med. A. Kretz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 28.10.2011

Julia Pester